Test à 139 variants de la fibrose kystique MiSeqDx(MC)

DESTINÉ AU DIAGNOSTIC IN VITRO UNIQUEMENT

Catalogue nº DX-102-1004 : 2 analyses, jusqu'à 96 échantillons par trousse

Catalogue nº DX-102-1003 : 20 analyses, jusqu'à 960 échantillons par trousse

Utilisation prévue

Le test à 139 variants de la fibrose kystique Illumina MiSeqDx est un système de diagnostic *in vitro* qualitatif permettant de détecter simultanément 139 des mutations pathogènes causant la fibrose kystique et les variants du gène régulateur de la conductance transmembranaire de la fibrose kystique (*CFTR*) cliniquement pertinents dans l'ADN génomique isolé à partir d'échantillons de sang total périphérique humain. Les variants comprennent les variants recommandés en 2004 par l'American College of Medical Genetics (ACMG, Collège américain de génétique médicale)[1] et en 2011 par l'American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG, Collège américain des obstétriciens et gynécologues)[2]. Ce test est destiné au dépistage des porteurs chez des adultes en âge de procréer, à des tests de confirmation de diagnostic chez des nouveau-nés et des enfants, et en tant que test initial pour faciliter le diagnostic d'individus soupçonnés d'avoir la fibrose kystique. Les résultats de ce test doivent être interprétés par un généticien moléculaire clinicien diplômé ou équivalent et doivent être utilisés avec les autres renseignements cliniques et de laboratoire disponibles.

Ce test n'est pas indiqué pour le dépistage néonatal, pour les tests de diagnostic fœtal, pour les tests pré-implantatoires ou à des fins de diagnostic autonome.

Le test est destiné à être utilisé sur l'instrument Illumina MiSeqDx.

Résumé et explication du test

Description clinique

La fibrose kystique (FK) est l'un des troubles génétiques les plus courants du monde occidental et le trouble autosomique récessif mortel le plus répandu au sein de la population blanche non hispanique[3-7]. La FK influe sur la viscosité des sécrétions de mucus et affecte l'épithélium des voies respiratoires, le pancréas, l'intestin, le système hépatobiliaire, l'appareil génital masculin et les glandes sudoripares, entraînant une maladie complexe touchant différents organes[4-6]; les poumons sont le premier système organique associé à la morbidité et à la mortalité[8]. Dans de nombreux cas, un déficit nutritionnel laisse présager une progression de l'atteinte des poumons liée à la FK. Un point clé des efforts d'intervention actuels est le diagnostic précoce par le biais d'un dépistage néonatal[7]. L'individu a ainsi accès aux soins dès son plus jeune âge et l'évolution de la maladie peut être mieux contrôlée[4,7]. Même si le sexe influe sur les chances de survie (l'espérance de vie médiane étant plus élevée chez les hommes que chez les femmes), l'espérance de vie médiane globale est de 38,3 ans aux États-Unis[8].

Variants *CFTR* et incidence

Le gène régulateur de la perméabilité transmembranaire de la fibrose kystique (*CFTR*), identifié en 1989, est situé sur le bras long du chromosome 7 et contient 27 exons codants répartis sur 230 kb[4]. Un ARNm 6,5 kb produit par un allèle normal code le CFTR, une protéine intrinsèque de l'amino-acide 1 490 qui fonctionne comme un canal chlorure régulé dans les cellules épithéliales de nombreux organes[4,5]. Plus de 1 900 variants du *CFTR* sont actuellement décrits, la majorité étant des mutations ponctuelles[9]. Le variant *CFTR* le plus courant est l'allèle F508del[5], qui représente presque

70 % de tous les variants *CFTR*[3]. D'autres variants *CFTR* courants se traduisent souvent par un phénotype de fibrose kystique ou des troubles liés au CFTR[3-5].

Les estimations de l'incidence et de la prévalence de la fibrose kystique sont respectivement d'une naissance sur 2 000 à 4 000 et d'environ 30 000 individus aux États-Unis[4]. Toutes les ethnies sont touchées, à des fréquences variables : 1 sur 3 000 Caucasiens; 1 sur 9 200 Hispano-américains; 1 sur 10 900 Amérindiens; 1 sur 15 000 Afro-Américains et 1 sur 31 000 Asio-Américains[4,6]. Les estimations actuelles de la fréquence d'un porteur de mutation du gène CFTR par groupe ethnique aux États-Unis, basées sur une cohorte de 364 890 individus faisant l'objet d'un test de dépistage et sans antécédents familiaux de fibrose kystique sont fournies dans le Tableau 1.

Tableau 1 Fréquence générale des porteurs de mutation du gène de la fibrose kystique selon les groupes ethniques aux États-Unis[10]

Groupe ethnique	Fréquence des porteurs observée
Afro-Américains	1 sur 84
Juifs Ashkénazes	1 sur 29
Asiatiques	1 sur 242
Caucasiens	1 sur 28
Hispaniques	1 sur 59
Juifs	1 sur 32
Moyen-Orientaux	1 sur 91
Amérindiens	1 sur 70
Sud-asiatiques	1 sur 118
Autre groupe ethnique	1 sur 111
Groupe ethnique > 1	1 sur 34
En partie afro-américains	1 sur 56
En partie caucasiens	1 sur 32
En partie hispaniques	1 sur 51
Non indiqué	1 sur 37
Tous les individus	1 sur 38

Présentation du projet CFTR2

Le projet CFTR2 est une initiative internationale menée par une équipe de chercheurs et de cliniciens, qui est soutenue par une subvention de la National Institute of Health et de la U.S. Cystic Fibrosis Foundation.[11,12] Le projet CFTR2 vise à fournir des renseignements cliniques et fonctionnels, à la fois complets et révisés par des experts, sur les variants *CFTR*. Dans le but de valider cliniquement tous les variants de la fibrose kystique avec des fréquences d'allèle de 0,01 % et plus, 25 registres et cliniques traitant la fibrose kystique dans le monde[13]ont rassemblé des ressources afin de faire le rapprochement entre des renseignements cliniques provenant de plus de 39 000 patients atteints de la fibrose kystique, avec près de 1 900 variants de la fibrose kystique qui ont été enregistrés au fil des années dans la base de données CFTR1 de l'Hôpital pour enfants malades de Toronto.[11,13] Des caractéristiques cliniques, comme la concentration de chlorure dans la sueur, les fonctions pulmonaires (FEV 1 % prévu) et l'état du pancréas ont été analysées avec les renseignements sur le génotype *CFTR*. L'approche systématique consistant à analyser simultanément ces variants des points de vue clinique, fonctionnel et génétique a permis de générer 134 variants uniques provoquant la fibrose kystique au niveau de 129 positions génomiques uniques (étant donné que pour cinq positions, deux modifications de nucléotide apparaissent à la même position) actuellement contenus dans la base de données CFTR2 (depuis août 2013). L'utilisation d'un panel comprenant tous ces variants devrait représenter 95,4 % des allèles provoquant la fibrose kystique et faire augmenter de 72 % à environ 91 % le taux d'identification des couples présentant un risque par le biais d'une détection des deux allèles, et en utilisant le panel de 23 variants recommandé par l'ACMG.

Variants *CFTR* dans un panel

Les variants rapportés par le Test à 139 variants de la fibrose kystique MiSeqDx(MC) ont été spécifiquement choisis, car ils représentent l'ensemble complet de variants validés sur le plan clinique qui sont classés comme provoquant la fibrose kystique dans la base de données CFTR2 à l'université Johns Hopkins, un produit de l'initiative CFTR2 (Clinical and Functional Translation of CFTR).

Le test est prévu pour : 134 variants provoquant la fibrose kystique; un variant de panel recommandé par l'ACMG (R117H, classé comme une mutation aux conséquences cliniques variables ou MVCC, selon CFTR2); un variant de modification rapporté sous certaines conditions (PolyTG/PolyT); et trois variants bénins rapportés sous certaines conditions (I506V, I507V, F508C)[14]; pour un total de 139 variants rapportés.

Les 134 variants provoquant la fibrose kystique correspondent aux 129 variants provoquant la fibrose kystique dans la base de données CFTR2. La base de données CFTR2 comprend cinq variants provoquant la fibrose kystique pour lesquels la même modification de niveau de protéine peut provenir de deux modifications de nucléotide distinctes [p. ex., S466X(C>A) et S466X(C>G)]. Ces cinq variants sont répertoriés en fonction du codon d'acide aminé dans la base de données CFTR2 (p. ex., S466X) tandis que le test rapporte chaque variant individuel [p. ex., S466X(C>A) et S466X (C>G)]. La liste des 139 variants rapportés par Test à 139 variants de la fibrose kystique MiSeqDx(MC) est fournie dans le Tableau 2.

Tableau 2 Test à 139 variants de la fibrose kystique MiSeqDx(MC) Résumé des variants
[répertoriés dans l'ordre de coordonnées génomiques; **Gras**=ACMG-23; *Italique*=Rapporté sous certaines conditions]

M1V	T338I	Q552X	3121-1G>A
CFTR dele2,3	1154insTC	**R553X**	3272-26A>G
Q39X	S341P	A559T	L1065P
E60X	R347H	**R560T**	R1066C
P67L	**R347P**	R560K	R1066H
R75X	R352Q	1811+1.6 kb A>G	L1077P
G85E	1213delT	1812-1 G>A	W1089X
394delTT	1248+1G>A	E585X	Y1092X(C>A)
405+1 G>A	1259insA	**1898+1G>A**	Y1092X(C>G)
406-1G>A	W401X (c.1202G>A)	1898+3A>G	M1101K
E92X	W401X (c.1203G>A)	2143delT	E1104X
E92K	1341+1G>A	R709X	R1158X
Q98X	*PolyTG/PolyT*	K710X	**R1162X**
457TAT>G	1461ins4	2183delAA>G	**3659delC**
D110H	**A455E**	2184insA	S1196X
R117C	1525-1G>A	**2184delA**	W1204X (c.3611G>A)
R117H	S466X (C>A)	2307insA	W1204X (c.3612G>A)
Y122X	S466X (C>G)	L732X	3791delC
574delA	L467P	2347delG	**3849+10kbC>T**
621+1G>T	1548delG†	R764X	G1244E
663delT	S489X	2585delT	3876delA
G178R	S492F	E822X	S1251N
711+1G>T	Q493X	2622+1G>A	3905insT
711+3A>G	**I507del**	E831X	**W1282X**
711+5 G>A	**F508del**	W846X	4005+1G>A
712-1 G>T	1677delTA	R851X	**N1303K**
H199Y	V520F	2711delT	4016insT
P205S	Q525X†	**2789+5G>A**	Q1313X
L206W	1717-8G>A	Q890X	4209TGTT>AA
Q220X	**1717-1G>A**	L927P	CFTRdele22,23

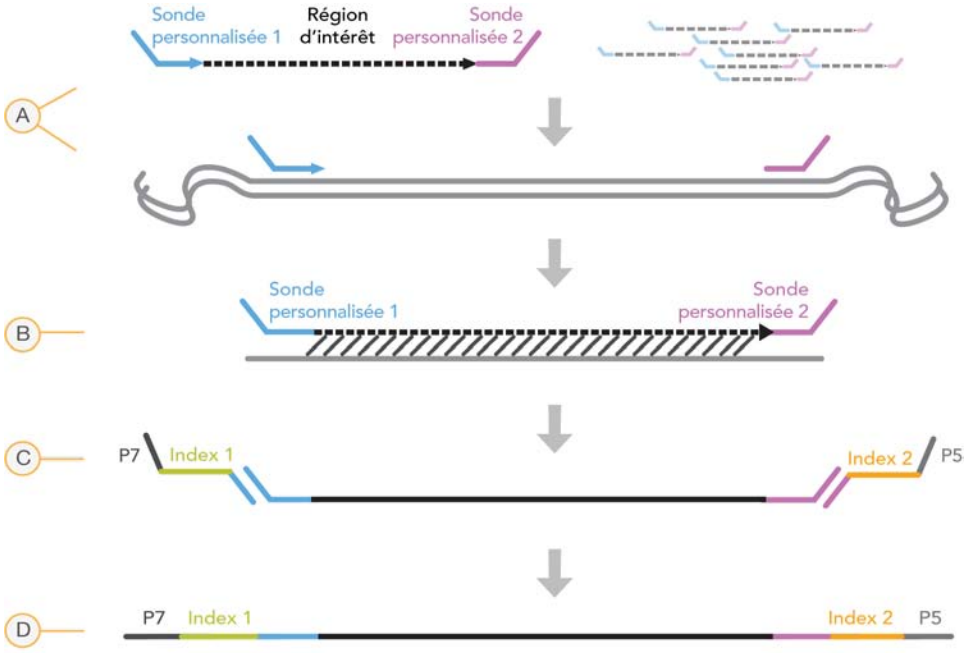
852del22	**G542X**	S945L	4382delA
1078delT	S549R (c.1645A>C)	3007delG	*I506V*
G330X	S549R (c.1647T>G)	G970R	*I507V*
R334W	S549N	3120G>A	*F508C*
I336K	**G551D**	**3120+1G>A**	

† Classé dans la base de données du CFTR2[12] comme un variant provoquant la fibrose kystique, tandis que l'article Sosnay[13] le classe parmi les variants indéterminés. La classification de la base de données est plus actuelle et s'appuie sur le test fonctionnel achevé, qui n'était pas disponible à l'époque de la publication de Sosnay.

Principes procéduraux

Le Test à 139 variants de la fibrose kystique MiSeqDx Illumina implique deux procédures principales. La première consiste à préparer manuellement les échantillons à séquencer et s'appelle « préparation de la librairie ». La préparation de la librairie comporte quatre étapes clés : l'hybridation, l'extension-ligation, l'amplification de PCR et la normalisation de librairie. La deuxième procédure consiste à séquencer l'échantillon préparé à l'aide de la chimie SPS (séquençage par synthèse) sur le MiSeqDx.

Préparation de la librairie



A **Hybridation** : la première étape, l'hybridation, hybride un groupe d'oligonucléotides en amont et en aval spécifiques au Test à 139 variants de la fibrose kystique MiSeqDx(MC) en échantillon d'ADN génomique. À la fin du processus, une procédure de lavage en trois étapes avec un filtre capable de sélectionner la taille retire les oligonucléotides non liés de l'ADN génomique.

B **Extension-ligation** : la deuxième étape, l'extension-ligation, connecte les oligonucléotides en amont et en aval hybridés. Une ADN polymérase s'étend de l'oligonucléotide en amont jusqu'à la région ciblée, suivie d'une ligation à l'extrémité 5′ de l'oligonucléotide en aval en utilisant une ADN ligase. Le résultat est la formation de produits contenant des oligonucléotides spécifiques à la FK bordés de séquences nécessaires pour l'amplification.

C **Amplification de PCR** : la troisième étape, l'amplification de PCR, amplifie les produits d'extension-ligation à l'aide de primers qui ajoutent les séquences d'indexage pour le multiplexage des échantillons, tout comme les

adaptateurs courants nécessaires à la génération d'amplifiats sur le MiSeqDx. À la fin de ce processus, une procédure de nettoyage de PCR purifie les produits PCR (désignés comme une librairie).

D **Normalisation de librairie** : la dernière étape, la normalisation de librairie, normalise la quantité de chaque librairie pour assurer une représentation plus égale dans la dernière librairie regroupée. À la fin de ce processus, la librairie regroupée est chargée dans le MiSeqDx pour le séquençage à l'aide de la chimie SBS.

Séquençage

La chimie SBS utilise une méthode basée sur des terminateurs réversibles pour détecter des bases à simple nucléotide à mesure qu'elles sont intégrées aux brins d'ADN croissants. Pendant chaque cycle de séquençage, un seul triphosphate de déoxynucléotide (dNTP) marqué par fluorescence est ajouté à la chaîne d'acide nucléique. L'étiquette du nucléotide sert de terminateur pour la polymérisation. Ainsi, après chaque incorporation de dNTP, le marqueur fluorescent est imagé pour identifier la base, puis enzymatiquement clivée pour permettre l'incorporation du nucléotide suivant. Étant donné que les quatre dNTP liés à des terminateurs réversibles (A, G, T, C) sont tous présents comme molécules seules et séparées, la compétition naturelle minimise le biais lié à l'incorporation. Les définitions des bases sont effectuées directement à partir des mesures d'intensité de signal pendant chaque cycle de séquençage. Le résultat final est le séquençage base par base.

Analyse des données

MiSeq Reporter traite les définitions des bases générées pendant l'analyse primaire et fournit des renseignements sur chaque échantillon, en fonction des renseignements spécifiés sur la feuille d'échantillons, appelée analyse secondaire. L'analyse secondaire comprend le démultiplexage, la génération de fichiers FASTQ, l'alignement, l'appel des variants et la génération de fichiers VCF contenant des renseignements sur les variants CFTR à des positions spécifiques dans le génome de référence.

- **Démultiplexage** : il s'agit de la première étape de l'analyse secondaire si la feuille d'échantillons répertorie plusieurs échantillons et si l'analyse présente des lectures d'index. Le démultiplexage sépare les données d'échantillons regroupés basées sur les index de séquence unique qui ont été ajoutés au cours de l'étape d'amplification de PCR.
- **Génération de fichiers FASTQ** : après le démultiplexage, MiSeq Reporter génère des fichiers intermédiaires au format FASTQ, qui est un format texte utilisé pour représenter des séquences. Les fichiers FASTQ contiennent les lectures pour chaque échantillon ainsi que les scores de qualité, à l'exclusion des lectures provenant de tout amplifiat qui n'est pas passé par le filtre.
- **Alignement** : l'alignement compare les séquences par rapport à la référence pour identifier une relation entre les séquences et attribue un score en fonction des régions de similarité. Les lectures alignées sont écrites dans des fichiers au format BAM. MiSeq Reporter utilise un algorithme de Smith-Waterman par bande qui effectue des alignements de séquence locaux pour identifier les régions similaires entre deux séquences.
- **Appel des variants** : cette étape enregistre des variants à simple nucléotide (SNV), des insertions et des délétions (indels), et autres variants structurels dans un fichier de test standardisé appelé MiSeqDxCF139VariantAssay.txt. Pour plus de renseignements, consultez la section Fichier de rapport d'analyse dans le *Guide de l'utilisateur de MiSeq Reporter (nº 15038356_FRA)*.

Limites de la procédure

1 Destiné au diagnostic *in vitro*. Les résultats obtenus à l'aide du Test à 139 variants de la fibrose kystique MiSeqDx Illumina doivent être utilisés et interprétés dans le contexte d'une évaluation clinique complète.
2 Le test est conçu pour identifier un sous-ensemble spécifique de variants connus dans le gène *CFTR*, mais n'inclut pas tous les variants identifiés dans le gène *CFTR*. Par conséquent, si un variant n'est pas identifié, cela ne garantit pas que d'autres variants *CFTR* ne sont pas présents dans les échantillons analysés.
3 Les variants identifiés par le biais de ce test varient en fréquence parmi les différentes populations.

4 Comme avec n'importe quel test basé sur l'hybridation, les polymorphismes ou variants sous-jacents dans les régions de liaison d'un oligonucléotide peuvent affecter les allèles sondés et, par conséquent, les appels faits.
5 Le test ne permet pas de déterminer si l'orientation du variant PolyTG/PolyT est en cis/trans sur le variant R117H. Pour les patients présentant un variant R117H, des tests supplémentaires doivent être effectués pour déterminer si un variant PolyTG/PolyT, qui peut affecter le phénotype clinique (p. ex., 12-13(TG) ou 5T), présente une orientation cis/trans sur le variant R117H.
6 PolyTG/PolyT sont des régions homopolymériques connues pour être difficiles à interpréter avec des tests basés sur le séquençage en raison du glissement de polymérase. Un taux de 0,9 % (4/448) de ratés de typage a été observé pour des résultats PolyTG/PolyT démontrant un écart de ±1 TG par rapport au séquençage bidirectionnel Sanger (Tableau 17).

Composants du produit

La plateforme Illumina MiSeqDx comprend les composants suivants :

- Test à 139 variants de la fibrose kystique MiSeqDx(MC) (Nº de référence DX-102-1004 ou DX-102-1003)
- MiSeqDx Instrument (Nº de référence DX-410-1001)

Réactifs

Réactifs fournis

Les réactifs pour le test à 139 variants de la fibrose kystique MiSeqDx(MC) Illumina sont fournis par Illumina. Le catalogue nº DX-102-1003 a été configuré pour 20 analyses avec un maximum de 48 échantillons par analyse (jusqu'à 960 échantillons au total). Le catalogue nº DX-102-1004 a été configuré pour 2 analyses avec un maximum de 48 échantillons par analyse (jusqu'à 96 échantillons au total).

Test à 139 variants de la fibrose kystique MiSeqDx(MC), Boîte 1

Tableau 3 Boîte 1A de réactifs de pré-amplification

Composant	Quantité		Volume de remplissage	Ingrédients actifs	Stockage
	DX-102-1003	DX-102-1004			
Pool d'oligonucléotides à 139 variants de la fibrose kystique	10 tubes	1 tube	600 µl	Solution aqueuse tamponnée contenant des oligonucléotides ciblant le gène *CFTR*	
Tampon d'hybridation	10 tubes	1 tube	4,32 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels et du formamide	-15 °C à -25 °C
Mélange extension-ligation	10 tubes	1 tube	4,8 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant un mélange exclusif d'ADN polymérases, de ligase ADN et des dNTP	-15 °C à -25 °C
Primers d'indexage A (A501) – H (A508)	10 tubes par primer	1 tube par primer	192 µl	Primer PCR avec des séquences d'indexage et des adaptateurs de séquençage	-15 °C à -25 °C
Primers d'indexage 1 (A701) – 12 (A712)	10 tubes par primer	1 tube par primer	128 µl	Primers PCR avec séquences d'indexage et adaptateurs de séquençage	-15 °C à -25 °C
Polymérase PCR	10 tubes	1 tube	56 µl	ADN polymérase exclusif	-15 °C à -25 °C
Mélange maître PCR	10 tubes	1 tube	2,8 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels et des dNTP	-15 °C à -25 °C

Tableau 4 Boîte 1B de réactifs de post-amplification

Composant	Quantité		Volume de remplissage	Ingrédients actifs	Stockage
	DX-102-1003	DX-102-1004			
Diluant de normalisation de librairie	10 tubes	1 tube	4,6 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels, du 2-mercaptoéthanol et du formamide	-15 °C à -25 °C
Tampon de dilution de librairie	10 tubes	1 tube	4,5 ml	Solution aqueuse tamponnée	-15 °C à -25 °C
Contrôle interne PhiX	1 tube	1 tube	10 µl	Solution aqueuse tamponnée contenant l'ADN génomique PhiX	-15 °C à -25 °C

Test à 139 variants de la fibrose kystique MiSeqDx(MC), Boîte 2

Tableau 5 Boîte 2 de réactifs de post-amplification

Composant	Quantité		Contenu	Stockage
	DX-102-1003	DX-102-1004		
Test à 139 variants de la cartouche de réactifs et fibrose kystique MiSeqDx	20 cartouches	2 cartouches	Cartouche à usage unique contenant une génération d'amplifiats et des réactifs de séquençage pour une utilisation avec le MiSeqDx, comprenant du formamide, du 2-mercaptoéthanol et < 2 % de DMSO	-15 °C à -25 °C

Test à 139 variants de la fibrose kystique MiSeqDx(MC), Boîte 3

Tableau 6 Boîte 3A de réactifs de pré-amplification

Composant	Quantité		Volume de remplissage	Ingrédients actifs	Stockage
	DX-102-1003	DX-102-1004			
Tampon de lavage rigoureux	10 flacons	1 flacon	24 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels, du 2-mercaptoéthanol et du formamide	2 °C à 8 °C
Tampon de lavage universel	10 tubes	1 tube	4,8 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels	2 °C à 8 °C

Tableau 7 Boîte 3B de réactifs de post-amplification

Composant	Quantité		Volume de remplissage	Ingrédients actifs	Stockage
	DX-102-1003	DX-102-1004			
Billes de nettoyage PCR	10 tubes	1 tube	5 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant des billes paramagnétiques en phase solide et du polyéthylène glycol	2 °C à 8 °C
Lavage de normalisation de librairie	20 tubes	2 tubes	4,8 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels, du 2-mercaptoéthanol et du formamide	2 °C à 8 °C
Billes de librairie	10 tubes	1 tube	1,2 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant des billes paramagnétiques en phase solide	2 °C à 8 °C
Test à 139 variants de la Flow Cell et fibrose kystique MiSeqDx	20 conteneurs	2 conteneurs	1 Flow Cell	Substrat en verre avec des oligonucléotides liés par covalence	2 °C à 8 °C

Test à 139 variants de la fibrose kystique MiSeqDx(MC), Boîte 4

Tableau 8 Boîte 4 de réactifs de post-amplification

Composant	Quantité		Volume de remplissage	Ingrédients actifs	Stockage
	DX-102-1003	DX-102-1004			
Test à 139 variants de la solution SBS (PR2) et fibrose kystique MiSeqDx	20 flacons	2 flacons	353,1 ml	Solution aqueuse tamponnée	2 °C à 8 °C

Test à 139 variants de la fibrose kystique MiSeqDx(MC), Boîte 5

Tableau 9 Boîte 5 de réactifs de pré-amplification

Composant	Quantité		Volume de remplissage	Ingrédients actifs	Stockage
	DX-102-1003	DX-102-1004			
Plaque filtrante	20 plaques	2 plaques	S.O.	Plaque de microtitration en polypropylène avec une membrane en polyéthersulfone modifiée	15 °C à 30 °C

Tableau 10 Boîte 5 de réactifs de post-amplification

Composant	Quantité		Volume de remplissage	Ingrédients actifs	Stockage
	DX-102-1003	DX-102-1004			
Tampon d'élution	10 tubes	1 tube	4,8 ml	Solution aqueuse tamponnée	15 °C à 30 °C
Tampon de stockage de librairie	10 tubes	1 tube	3,5 ml	Solution aqueuse tamponnée	15 °C à 30 °C

Réactifs nécessaires, non fournis

Réactif de pré-amplification

- 10 N NaOH (préparez à partir de comprimés ou utilisez une solution standard)
- Tampon TE
- Eau exempte d'ADNase et d'ARNase

Réactifs de post-amplification

- 10 N NaOH (préparez à partir de comprimés ou utilisez une solution standard)
- Éthanol 200 pour la biologie moléculaire
- Tampon TE
- Eau exempte d'ADNase et d'ARNase

Stockage et manipulation

1. La température ambiante correspond à une température de 15 °C à 30 °C.
2. Les réactifs suivants sont expédiés congelés et sont stables lorsque stockés entre -15 °C et -25 °C jusqu'à la date d'expiration indiquée.
   - Pool d'oligonucléotides à 139 variants de la fibrose kystique
   - Tampon d'hybridation
   - Mélange extension-ligation
   - Primers d'indexage A (A501) – H (A508)
   - Primers d'indexage 1 (A701) – 12 (A712)
   - Polymérase PCR

- Mélange maître PCR
- Diluant de normalisation de librairie
- Tampon de dilution de librairie
- Contrôle interne PhiX
- Test à 139 variants de la cartouche de réactifs et fibrose kystique MiSeqDx

Excepté pour la cartouche de réactifs, les réactifs sont stables pendant un maximum de 6 cycles de congélation/décongélation qui peuvent se produire avant la date d'expiration indiquée.

Ne pas recongeler la cartouche de réactifs après qu'elle a été décongelée. Elle peut être conservée pendant un maximum de 6 heures entre 2 °C et 8 °C.

3 Les réactifs suivants sont expédiés réfrigérés et sont stables lorsque stockés entre 2 °C et 8 °C jusqu'à la date d'expiration indiquée.
- Tampon de lavage rigoureux
- Tampon de lavage universel
- Billes de nettoyage PCR
- Billes de librairie
- Lavage de normalisation de librairie
- Test à 139 variants de la solution SBS (PR2) et fibrose kystique MiSeqDx
- Test à 139 variants de la Flow Cell et fibrose kystique MiSeqDx

4 Les réactifs suivants sont expédiés ambiantes et sont stables lorsque stockés à température ambiante jusqu'à la date d'expiration indiquée.
- Tampon d'élution
- Plaque filtrante
- Tampon de stockage de librairie

5 Les changements dans l'apparence physique des réactifs fournis peuvent indiquer la détérioration des matières. Si des changements dans l'apparence physique se produisent (par. ex. des changements apparents de la couleur des réactifs ou une trace de voile apparente montrant une contamination microbienne), ne pas utiliser les réactifs.

6 Les réactifs tampon d'hybridation, tampon de lavage rigoureux et diluant de normalisation de librairie peuvent former des précipités ou des cristaux visibles. Avant l'utilisation, secouez vigoureusement à l'aide d'un agitateur vortex, puis inspectez visuellement pour s'assurer qu'il n'y ait aucune précipitée.

7 Suivez à la lettre les meilleures pratiques suivantes lors de la manipulation de billes de nettoyage PCR et billes de librairie :
- Les billes ne doivent jamais être congelées.
- Laissez les billes atteindre la température ambiante.
- Immédiatement avant l'utilisation, secouez vigoureusement à l'aide d'un agitateur vortex jusqu'à ce que ce soit bien suspendu et que la couleur apparaisse homogène.
- Mélangez bien l'échantillon après que les billes ont été ajoutées en pipettant de haut en bas 10 fois. Un agitateur peut être utilisé pour bien mélanger les échantillons.
- Incubez le mélange bille/échantillon à température ambiante pendant la durée totale indiquée.
- Suivez les instructions lorsque vous utilisez un brin magnétique. Attendez que la solution soit claire avant d'aspirer. Gardez la plaque sur le support magnétique lorsque vous aspirez doucement le surnageant, en prenant soin de ne pas déranger les billes séparées.

8 La plaque d'amplification de PCR peut rester sur la platine thermique toute la nuit, ou elle peut être conservée entre 2 °C et 8 °C pendant un maximum de deux jours. Avant le stockage de la plaque entre 2 °C et 8 °C, scellez bien la plaque.

9 Ne pas congeler les billes de librairie ou mélangez au réactif diluant de normalisation de librairie si elles ne sont pas utilisées immédiatement.

10 La plaque de normalisation de librairie terminée peut être conservée entre -15 °C et -25 °C pendant un maximum de trois jours.
11 La librairie d'ensembles d'amplicons peut être conservée entre -15 °C et -25 °C pendant un maximum de trois jours.
12 Chargez immédiatement le groupe d'amplicons fraîchement dilués dans la cartouche de réactifs. Le stockage du groupe d'amplicons dilués peut entraîner une réduction considérable de la densité d'amplifiats.

Matériels et équipement

Équipement et matériel fournis, vendus séparément

1 **MiSeqDx Instrument**, catalogue nº DX-410-1001
2 **Trousse de montage de plaque d'index TruSeq**, nº de référence FC-130-1005
3 **Trousse de montage de plaque d'index et de collier TruSeq**, nº de référence FC-130-1007
4 **Bouchons de remplacement d'adaptateur d'index**, nº de référence DX-502-1003

Équipement et matériel nécessaires, non fournis

Matériels et équipement de pré-amplification

1 **Bloc chauffant** : un bloc chauffant pour une plaque à 96 puits est nécessaire. Le bloc chauffant doit être conforme aux spécifications de performance suivantes : Vous pouvez utiliser des blocs chauffants avec couvercles chauffés.
   — Plage de températures : ambiante +5 °C à 99 °C
   — Régulation de température : ±0,1 °C à 37 °C; ±0,4 °C à 60 °C
2 **Incubateur d'échantillons** : un incubateur (four à hybridation) est nécessaire. L'incubateur doit être conforme aux spécifications de performance suivantes :
   — Plage de températures : 10 °C à 100 °C
   — Régulation de température : ±0,2 °C
3 **Centrifugeuse de table** : une centrifugeuse de table pouvant maintenir une température de 20 °C est nécessaire. (une centrifugeuse séparée est nécessaire dans la zone de post-amplification). Vous pouvez utiliser n'importe quelle centrifugeuse pour plaques atteignant les vitesses indiquées par le protocole (280 à 2 400 × g).
4 **Pipettes de précision** : un ensemble de pipettes de précision est nécessaire. (un ensemble séparé est nécessaire dans la zone de post-amplification). L'utilisation de pipettes de précision est nécessaire pour s'assurer une distribution précise des réactifs et des échantillons. Les pipettes mono-canal ou multi-canal peuvent être utilisées si elles sont étalonnées régulièrement et sont précises à moins de 5 % du volume indiqué.
5 **Consommables** : les consommables suivants sont nécessaires.
   — Plaques PCR à jupe à 96 puits, 0,2 ml, en polypropylène ou équivalent
     REMARQUE : Assurez-vous que la plaque à 96 puits s'adapte parfaitement au support magnétique.
   — Plaques de stockage à 96 puits, 0,8 ml (plaques MIDI)
   — Bassin de solution, sans PVC ni DNase/RNase (cuve)
   — Opercule adhésif en aluminium
   — Joint approprié pour plaques PCR
   — Pointes de pipette résistantes à l'aérosol

Matériels et équipement de post-amplification

1 **Thermocycleur** : un thermocycleur est nécessaire. Le thermocycleur doit avoir un couvercle chauffé et respecter les spécifications de performance suivantes :
   — Plage de contrôle de la température : 4 °C à 99 °C
   — Précision du contrôle : ±0,25 °C de 35 °C à 99 °C

2 **Agitateur pour microplaques** : un agitateur pour microplaques est nécessaire dans la zone du laboratoire de post-amplification. L'agitateur pour microplaques doit être conforme aux spécifications de performance suivantes :
   — Vitesse de mélange max. : 3 000 tr/mn
   — Plage de vitesses de mélange : 200 à 3 000 tr/mn
3 **Centrifugeuse de table** : une centrifugeuse de table pouvant maintenir une température de 20 °C est nécessaire. (une centrifugeuse séparée est nécessaire dans la zone de pré-amplification). Vous pouvez utiliser n'importe quelle centrifugeuse pour plaques atteignant les vitesses indiquées par le protocole (280 à 2 400 × g).
4 **Bloc chauffant** : un bloc chauffant pour les tubes est nécessaire. Le bloc chauffant doit être conforme aux spécifications de performance suivantes :
   — Plage de températures : ambiante +5 °C à 99 °C
   — Régulation de température : ±0,1 °C à 37 °C; ±0,4 °C à 60 °C
5 **Support magnétique** : un support magnétique pour une plaque à 96 puits est nécessaire. Les meilleures performances sont atteintes lorsque les aimants sont du côté du support et non au fond.
6 **Pipettes de précision** : un ensemble de pipettes de précision est nécessaire. (un ensemble séparé est nécessaire dans la zone de pré-amplification). L'utilisation de pipettes de précision est nécessaire pour s'assurer une distribution précise des réactifs et des échantillons. Les pipettes mono-canal ou multi-canal peuvent être utilisées si elles sont étalonnées régulièrement et sont précises à moins de 5 % du volume indiqué.
7 **Consommables** : les consommables suivants sont nécessaires.
   — Plaques PCR à jupe à 96 puits, 0,2 ml, en polypropylène ou équivalent
     REMARQUE : Assurez-vous que la plaque à 96 puits s'adapte parfaitement au support magnétique.
   — Plaques de stockage à 96 puits, 0,8 ml (plaques MIDI)
   — Tubes coniques, 15 ml
   — Tubes de microcentrifugeuse Eppendorf (bouchon vissé recommandé)
   — Barrettes de huit tubes PCR
   — Bassin de solution, sans PVC ni DNase/RNase (cuve)
   — Opercule adhésif en aluminium
   — Timbre adhésif pour plaques
   — Pointes de pipette résistantes à l'aérosol

Collecte, transport et stockage des spécimens

REMARQUE
Manipulez tous les spécimens comme s'ils étaient des agents potentiellement infectieux.

1 Les spécimens de sang total recueillis dans les tubes K_2EDTA peuvent être utilisés.
2 Les spécimens de sang total peuvent être stockés pendant un maximum de sept jours à température ambiante, jusqu'à 30 jours entre 2 °C et 8 °C, ou jusqu'à 30 jours entre -15 °C et -25 °C.
3 Transportez le sang total pendant un maximum de sept jours à température ambiante, 30 jours entre 2 °C et 8 °C, ou 30 jours si congelé entre -15 °C et -25 °C. Le transport de sang total doit se conformer aux règlements nationaux, fédéraux, régionaux et locaux sur le transport d'agents étiologiques.
4 Aucun effet négatif sur les performances du test n'a été observé lorsque l'ADN génomique a été soumis à six cycles de congélation/décongélation.
5 Aucun effet négatif sur les performances du test n'a été observé sur les spécimens de sang total contenant un taux élevé de bilirubine, de cholestérol, de triglycérides, d'ETDA ou d'hémoglobine.

Avertissements et précautions

ATTENTION
Les lois fédérales restreignent la vente de ce dispositif, qui doit être vendu par un médecin ou sur ordonnance de ce dernier, ou tout autre praticien autorisé par la loi de l'État où il exerce à utiliser ou à ordonner l'utilisation du dispositif.

1. Certains composants de ce test contiennent du formamide, un amide aliphatique constituant probablement une toxine reproductive (pour plus de renseignements, consultez la section *Réactifs* à la page 6). Des risques de lésions corporelles peuvent survenir par inhalation, ingestion, contact avec la peau et contact avec les yeux. Mettez au rebut les conteneurs et tout contenu inutilisé conformément aux normes de sécurité gouvernementales locales applicables. Pour plus de renseignements, communiquez avec l'assistance technique d'Illumina.
2. Certains composants de ce test contiennent du 2-mercaptoéthanol, un agent réducteur (pour plus de renseignements, consultez la section *Réactifs* à la page 6). Des risques de lésions corporelles peuvent survenir par inhalation, ingestion, contact avec la peau et contact avec les yeux. Utilisez dans une zone bien aérée et mettez au rebut les conteneurs et tout contenu inutilisé conformément aux normes de sécurité gouvernementales locales applicables. Pour plus de renseignements, communiquez avec l'assistance technique d'Illumina.
3. Manipulez tous les spécimens comme s'ils étaient des agents potentiellement infectieux.
4. Le non-respect des procédures comme décrites peut entraîner des résultats erronés ou une baisse considérable de la qualité des échantillons.
5. Utilisez les précautions de routine en laboratoire Ne pas pipetter avec la bouche. Ne pas manger, boire ou fumer dans les zones de travail indiquées. Portez des gants jetables et des blouses de laboratoire lors de la manipulation des spécimens et des réactifs du test. Lavez-vous les mains soigneusement après avoir manipulé les spécimens et les réactifs du test.
6. Ne pas utiliser un composant du test au-delà de la date d'expiration indiquée sur l'étiquette du carton de la trousse. Ne pas interchanger les composants du test venant de lots de test différents. Notez que les lots de test sont indiqués sur l'étiquette du carton du test.
7. Conservez les composants du test à la température spécifiée dans les zones de préamplification et de post-amplification indiquées.
8. Des cycles de congélation/décongélation répétés (jusqu'à 6) des composants de la Boîte 1 ne compromettront pas l'intégrité du test.
9. Pour empêcher la dégradation des échantillons ou des réactifs, veillez à ce que toutes les vapeurs d'hypochlorite de sodium se dissipent avant de commencer le protocole.
10. Des pratiques de laboratoire appropriées et une bonne hygiène de laboratoire sont nécessaires pour empêcher les produits PCR de contaminer les réactifs, les instruments et les échantillons d'ADN génomique. La contamination des PCR peut causer des résultats incorrects et non fiables.
11. Pour éviter la contamination, veillez à ce que les zones de préamplification et de post-amplification aient des équipements dédiés (p. ex. pipettes, pointes de pipette, agitateur vortex et centrifugeuse).
12. Évitez la contamination croisée. Utilisez de nouvelles pointes de pipette entre les échantillons et entre chaque distribution des réactifs. Mélangez les échantillons à l'aide d'une pipette et centrifugez la plaque lorsque c'est indiqué. N'agitez pas les plaques. L'utilisation de pointes résistantes à l'aérosol réduit le risque de rétention d'amplicons et de contamination croisée d'un échantillon à l'autre.
13. Un pair index-échantillon doit correspondre exactement à la feuille de l'échantillon. Les inadéquations entre la feuille de l'échantillon et le schéma de la plaque entraîneront une perte de l'identification positive des échantillons et un rapport de résultats incorrect.
14. Toujours préparer de l'éthanol à 80 % frais pour les étapes de lavage. L'éthanol peut absorber l'eau présente dans l'air, ce qui affecte les résultats.
15. Assurez-vous que tout l'éthanol est retiré du fond des puits pendant les étapes de lavage. Des résidus d'éthanol pourraient affecter les résultats.

16 Respectez le temps de séchage indiqué après l'étape du support magnétique pour assurer une évaporation totale. L'éthanol résiduel peut modifier les performances des réactions ultérieures.
17 Ne pas mélanger le pool d'oligonucléotides à 139 variants de fibrose kystique et le tampon d'hybridation lors du stockage. Combiné, le pool d'oligonucléotides à 139 variants de fibrose kystique devient instable, même lorsqu'il est conservé congelé.
18 L'utilisation de thermocycleurs à refroidissement actif (p. ex., Peltier, avec refroidissement thermoélectrique) n'est pas recommandée pour l'étape d'hybridation. L'étape de refroidissement passif est essentielle pour une hybridation adéquate.
19 Ajoutez toujours le polymérase PCR au mélange maître PCR juste avant l'utilisation. Ne jamais conserver la solution de travail combinée.
20 Durant l'étape de normalisation de la librairie, il est extrêmement important de resuspendre complètement le culot des billes de la librairie. C'est essentiel pour parvenir à une densité consistante d'amplifiats sur la Flow Cell du MiSeqDx.
21 Respectez les temps d'incubation indiqués dans l'étape de normalisation de librairie. Une incubation inappropriée peut affecter la représentation de la librairie et la densité des amplifiats.
22 Étant donné le nombre de transferts de plaque et le risque subséquent de contamination, il faut être très vigilant et s'assurer que le contenu du puits reste entièrement dans le puits. Ne pas éclabousser les contenus.
23 La recommandation de 250 ng en matière d'entrée d'ADN permet de varier la quantité d'ADN; les performances des tests dépendent de ce niveau d'entrée.
24 Les variants d'échantillon portant la désignation « No Call » (Aucun-appel) sur le rapport des tests indiquent que les données correspondant à cette position de variant ne respectent pas les seuils de séquençage définis. Les variants portant la désignation « No Call » (Aucun-appel) ne doivent pas être rapportés, sauf si les tests répétés produisent des valeurs respectant les seuils définis et ne sont plus désignés comme « No Call » (Aucun-appel).

Notes procédurales

1 Illumina exige qu'un échantillon d'ADN à commande positive et un à commande négative (NTC ou aucune commande de modèle) soient inclus dans chaque analyse qui est définie comme une série d'échantillons traités en parallèle. L'échantillon d'ADN de contrôle positif doit être un échantillon correctement caractérisé présentant un ou plusieurs variants *CFTR* connus. Illumina recommande l'utilisation d'un contrôle de type sauvage. Le contrôle de type sauvage doit être exécuté comme un échantillon et ne doit pas remplacer le contrôle positif ou négatif.
2 Avant de commencer le test à 139 variants de la fibrose kystique MiSeqDx, extrayez et quantifiez l'ADN.
3 Toute méthode d'extraction d'ADN validée peut être utilisée.
4 Quantifiez l'ADN à l'aide d'un spectrophotomètre. Vérifiez que le A260/A280 de l'échantillon d'ADN est > 1,5. Normalisez l'échantillon d'ADN sur 50 ng/µl. Chaque échantillon nécessite 5 µl d'ADN génomique (250 ng au total).

Débit d'échantillons et représentation d'index

Pour le test à 139 variants de la fibrose kystique MiSeqDx Illumina, le débit d'échantillons par analyse MiSeqDx peut être de 8 à 48 échantillons. Les primers d'indexage utilisés pendant l'amplification par PCR doivent être basés sur le débit d'échantillons final souhaité pour assurer la diversité dans la séquence d'indexage.

REMARQUE
Pour une efficacité maximale du débit, procédez à la préparation de la librairie pour 96 échantillons au plus, puis répartissez les échantillons en deux analyses de séquençage avec un maximum de 48 échantillons par analyse.

MiSeqDx utilise un voyant DEL vert pour séquencer des bases G/T et un voyant DEL rouge pour séquencer des bases A/C. À chaque cycle, au moins un des deux nucléotides de chaque canal de couleur doit être lu pour assurer

l'enregistrement approprié. Il est important de maintenir l'équilibrage des couleurs pour chaque base de l'index lu en cours de séquençage, sinon l'échec de l'enregistrement pourrait se produire lors du séquençage de la lecture d'index.

Reportez-vous au Tableau 11 pour choisir des combinaisons de primers d'indexage pour des analyses de 48 ou 96 échantillons.

Tableau 11 Mélanges de primers d'indexage pour des analyses de séquençage avec 48 échantillons ou 96 échantillons

Rangées A–H	Colonnes 1–6	Colonnes 7 à 12
Primer d'indexage A (A501)	Primer d'indexage 1 (A701)	Primer d'indexage 6 (A706)
Primer d'indexage B (A502)	Primer d'indexage 2 (A702)	Primer d'indexage 7 (A707)
Primer d'indexage C (A503)	Primer d'indexage 3 (A703)	Primer d'indexage 8 (A708)
Primer d'indexage D (A504)	Primer d'indexage 4 (A704)	Primer d'indexage 9 (A709)
Primer d'indexage E (A505)	Primer d'indexage 5 (A705)	Primer d'indexage 11 (A711)
Primer d'indexage F (A506)	Primer d'indexage 10 (A710)	Primer d'indexage 12 (A712)
Primer d'indexage G (A507)	--	--
Primer d'indexage H (A508)	--	--

Si le séquençage est inférieur à 48 échantillons dans une analyse de séquençage, sélectionnez les index appropriés sur la base de leurs séquences pour maintenir l'équilibrage des couleurs dans les canaux verts et rouges. Consultez le Tableau 13 et le Tableau 14. Au minimum, les analyses avec 8 à 48 échantillons doivent comprendre des combinaisons de primers d'indexage identifiées dans Tableau 12.

Pour effectuer avec précision des analyses plus petites, au moins huit échantillons doivent être présents. Si six échantillons uniques (à l'exclusion des contrôles positifs et négatifs) ne sont pas disponibles, il convient d'effectuer l'analyse avec les répliques d'échantillon ou n'importe quel échantillon d'ADN génomique humain. Reportez-vous au Tableau 12 pour connaître le jeu d'index d'équilibrage des couleurs minimal à utiliser pour les analyses de séquençage à 8 échantillons.

Tableau 12 Mélanges de primers d'indexage pour des analyses de séquençage avec 8 échantillons

	Primer d'indexage 1 (A701)	Primer d'indexage 2 (A702)	Primer d'indexage 10 (A710)
Primer d'indexage C (A503)	Échantillon 1	Échantillon 2	Échantillon 3
Primer d'indexage D (A504)	Échantillon 4	Échantillon 5	Échantillon 6
Primer d'indexage E (A505)	Échantillon 7	Échantillon 8	--

Séquences de primers d'indexage

Tableau 13 Séquences de primers d'indexage A (A501) - H (A508)

Primer d'indexage	Séquence
Primer d'indexage A (A501)	TGAACCTT
Primer d'indexage B (A502)	TGCTAAGT
Primer d'indexage C (A503)	TGTTCTCT
Primer d'indexage D (A504)	TAAGACAC
Primer d'indexage E (A505)	CTAATCGA

Primer d'indexage	Séquence
Primer d'indexage F (A506)	CTAGAACA
Primer d'indexage G (A507)	TAAGTTCC
Primer d'indexage H (A508)	TAGACCTA

Tableau 14 Séquences de primers d'indexage 1 (A701) - 12 (A712)

Primer d'indexage	Sequence (Séquence)
Primer d'indexage 1 (A701)	ATCACGAC
Primer d'indexage 2 (A702)	ACAGTGGT
Primer d'indexage 3 (A703)	CAGATCCA
Primer d'indexage 4 (A704)	ACAAACGG
Primer d'indexage 5 (A705)	ACCCAGCA
Primer d'indexage 6 (A706)	AACCCCTC
Primer d'indexage 7 (A707)	CCCAACCT
Primer d'indexage 8 (A708)	CACCACAC
Primer d'indexage 9 (A709)	GAAACCCA
Primer d'indexage 10 (A710)	TGTGACCA
Primer d'indexage 11 (A711)	AGGGTCAA
Primer d'indexage 12 (A712)	AGGAGTGG

Mode d'emploi

MiSeqDx Préparation de la feuille d'échantillons

1. Dans l'écran de bienvenue de Gestionnaire de listes de travail Illumina (IWM), sélectionnez **Create Worklist** (Créer la liste de travail).
2. Dans le champ Test Type (Type de test), sélectionnez **Test de la FK à 139 variants**.
3. Dans le champ Worklist Name (Nom de la liste de travail), saisissez un nom pour la feuille d'échantillon.
   - Si l'identifiant du code à barres de la cartouche de réactifs alphanumérique est utilisé pour le nom de la feuille d'échantillon, le Logiciel d'exploitation MiSeq (MOS) trouve automatiquement la feuille d'échantillons.
   - Si vous utilisez un autre nom pour la feuille d'échantillons, le bouton **Browse** (Parcourir) situé dans le logiciel d'exploitation MiSeq (MOS) peut être utilisé afin de trouver la feuille d'échantillons appropriée.
4. [Facultatif] Entrez une description pour identifier l'analyse.
5. Assurez-vous que la date correspond à la date de début de l'analyse.
6. Sélectionnez **Next** (Suivant).

Saisir les renseignements d'échantillonnage

1. Dans l'onglet Table (Tableau) ou l'onglet Plate (Plaque), saisissez les renseignements suivants pour chaque puits d'échantillon :

a **Identifiant de l'échantillon** : saisissez un seul identifiant d'échantillon.
b **Index 1 et Index 2** : spécifiez l'adaptateur qui sera utilisé pour chaque lecture d'index.

2 [Facultatif] Pour enregistrer des renseignements plus détaillés sur les échantillons, saisissez un nom et une description.
3 [Facultatif] Pour identifier les témoins sur la plaque, sélectionnez Negative (Négatif) ou Positive (Positif) dans le menu déroulant **Control** (Témoin).
4 Accédez à l'onglet Plate Graphic (Plaque graphique) et utilisez les options **Copy to Clipboard** (Copier vers le bloc-notes) ou **Print** (Imprimer) pour capturer une image de la plaque d'échantillon.
5 Sélectionnez **Finish** (Terminer).

Hybridation des pools d'oligonucléotides

Préparation

1 Remettez le pool d'oligonucléotides à 139 variants de fibrose kystique, le tampon d'hybridation, les échantillons d'ADN génomique et l'échantillon de contrôle positif à température ambiante.
2 Mélangez vigoureusement le pool d'oligonucléotides à 139 variants de fibrose kystique et le tampon d'hybridation pour vous assurer que tous les précipités ont été complètement dissous, puis centrifugez brièvement les tubes pour recueillir le liquide.
3 Réglez un bloc chauffant de 96 puits à 95 °C.
4 Préchauffez un incubateur à 37 °C.
5 Créez la plaque d'échantillon en fonction du graphique de la plaque imprimé à partir de IWM.

Procédure

1 Prévoyez une nouvelle plaque PCR de 96 puits (ci-après dénommée la plaque **d'HYBRIDATION**).
2 Ajoutez 5 µl d'échantillon ou de contrôle à 50 ng/µl (250 ng total) dans les puits appropriés dans la plaque **d'HYBRIDATION**. Suivez la disposition de la plaque générée pour une sélection appropriée des puits.
3 Ajoutez 5 µl de pool d'oligonucléotides à 139 variants de fibrose kystique à tous les puits contenant l'ADN génomique.
4 Ajoutez 40 µl de tampon d'hybridation à chaque échantillon dans la plaque **d'HYBRIDATION**. Pipettez doucement vers le haut et le bas 3 à 5 fois pour mélanger.
5 Scellez la plaque **d'HYBRIDATION** et centrifugez à 1 000 × g à 20 °C pendant 1 minute.
6 Placez la plaque **d'HYBRIDATION** dans le bloc préchauffé à 95 °C et incubez pendant 1 minute.
7 Réduisez le bloc chauffant à 40 °C et continuez à incuber jusqu'à ce que le bloc chauffant atteigne 40 °C (environ 80 minutes).

Le refroidissement progressif est très important pour une bonne hybridation; par conséquent, les thermocycleurs PCR avec refroidissement actif (p. ex. Peltier avec refroidissement thermoélectrique) ne sont pas recommandés pour ce processus.

POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ

Après que le bloc chauffant ait atteint 40 °C, la plaque **d'HYBRIDATION** est stable lorsqu'elle est maintenue à 40 °C pendant 2 heures.

Retrait des oligonucléotides non liés

Préparation

1 Ramenez le mélange extension-ligation, le tampon de lavage rigoureux et le tampon de lavage universel à température ambiante, puis mélangez brièvement.
2 Assemblez l'unité d'assemblage de la plaque filtrante (ci-après désignée comme **FPU**) en ordre de haut en bas : couvercle, plaque filtrante, collier d'adaptateur et plaque MIDI.
3 Lavez au préalable la membrane de la plaque filtrante comme suit :
a Ajoutez 45 µl de tampon de lavage rigoureux à chaque puits.

b Couvrez la plaque filtrante avec un couvercle et centrifugez à 2 400 × g à 20 °C pendant 5 minutes.

Procédure

1 Retirez la plaque **HYB** du bloc chauffant et centrifugez à 1 000 × g à 20 °C pendant 1 minute.
2 Transférez le volume total (environ 55 µl) de chaque échantillon aux puits correspondants de la plaque filtrante.
3 Couvrez la plaque filtrante avec un couvercle et centrifugez à 2 400 × g à 20 °C pendant 5 minutes.
4 Lavez la plaque filtrante comme suit :
   a Ajoutez 45 µl de tampon de lavage rigoureux à chaque puits d'échantillon.
   b Couvrez la plaque filtrante avec un couvercle et centrifugez à 2 400 × g à 20 °C pendant 5 minutes.
5 Répétez le lavage comme décrit à l'étape précédente.

REMARQUE
Si le tampon de lavage ne s'égoutte pas complètement, centrifugez encore à 2 400 × g à 20 °C jusqu'à ce que tout le liquide ait disparu (5 à 10 minutes supplémentaires).

6 Jetez tout liquide circulant (contenant du formamide), puis réassemblez la **FPU**.
7 Ajoutez 45 µl de tampon de lavage universel à chaque puits d'échantillon.
8 Couvrez la plaque filtrante avec un couvercle et centrifugez à 2 400 × g à 20 °C pendant 10 minutes.

REMARQUE
Veillez à ce que tout liquide soit vidé après la centrifugation. Répétez la centrifugation si nécessaire.

Extension-ligature des oligonucléotides liés

Procédure

1 Ajoutez 45 µl de mélange extension-ligation à chaque puits d'échantillon de la plaque filtrante.
2 Scellez la plaque filtrante avec une feuille d'aluminium adhésive, puis posez le couvercle.
3 Incubez le **FPU** dans l'incubateur préchauffé à 37 °C pendant 45 minutes.

Amplification de la PCR

Préparation

1 Préparez une nouvelle solution 0,05 N NaOH
2 Déterminez les primers d'indexage à utiliser selon le graphique de plaque imprimé à partir de Gestionnaire de listes de travail Illumina.
3 Ramenez le mélange maître PCR et les primers d'indexage appropriées à la température ambiante. Mélangez chaque tube décongelé, puis centrifugez brièvement les tubes.
4 Prévoyez une nouvelle plaque PCR à 96 puits (ci-après dénommée la plaque **AMP**).
5 Ajoutez des primers d'indexage à la plaque AMP comme suit :
   a Ajoutez 4 µl des primers d'indexage sélectionnées [A (A501) – H (A508)] au puits approprié dans une colonne de la plaque **AMP**.
   b Mettez au rebut les bouchons blancs d'origine et utilisez des bouchons blancs neufs.
   c Ajoutez 4 µl des primers d'indexage sélectionnées [1 (A701) – 12 (A712)] à la rangée appropriée de la plaque **AMP**. ***Les extrémités doivent être changées après chaque rangée pour éviter la contamination croisée de l'index.***
   d Mettez au rebut les bouchons orange d'origine et utilisez des bouchons orange neufs.
6 Préparez la solution de travail PCR mélange maître PCR/polymérase PCR comme suit :
   a Pour 96 échantillons, ajoutez 56 µl de Polymérase PCR à 2,8 ml de mélange maître PCR.
   b Retournez la solution de travail PCR préparée 20 fois pour la mélanger.

   La solution de travail PCR est stable à température ambiante pendant 10 minutes.

Procédure

1 Retirez le **FPU** de l'incubateur, puis enlevez l'opercule en aluminium.
2 Couvrez la plaque filtrante avec un couvercle et centrifugez à 2 400 × g à 20 °C pendant 2 minutes.
3 Ajoutez 25 µl de 0.05 N NaOH à chaque puits d'échantillon sur la plaque filtrante. Pipettez la solution NaOH de haut en bas 5 à 6 fois.
4 Recouvrez et incubez la plaque filtrante à la température ambiante pendant 5 minutes.
5 Pendant que la plaque filtrante est en incubation, transférez 22 µl de la solution de travail PCR à chaque puits de la plaque AMP contenant des primers d'indexage.
6 Transférez les échantillons élués du filtre à la plaque AMP comme suit :
   a Pipettez les échantillons de la première colonne de la plaque filtrante de haut en bas 5 à 6 fois.
   b Transférez 20 µl de la plaque filtrante à la colonne correspondante de la plaque **AMP**.
   c Pipettez doucement de haut en bas 5 à 6 fois pour combiner soigneusement l'ADN à la solution de travail PCR.
   d Transférez les autres colonnes de la plaque filtrante à la plaque AMP en procédant de la même manière. ***Les extrémités doivent être changées après chaque colonne pour éviter la contamination croisée de l'index et de l'échantillon.***
7 Scellez la plaque **AMP** et sécurisez avec un rouleau en caoutchouc.
8 Centrifugez à 1 000 × g à 20 °C pendant 1 minute.
9 Transférez la plaque AMP vers la zone de post-amplification.
10 Réalisez la PCR en utilisant le programme suivant sur un thermocycleur :
   — 95 °C pendant 3 minutes
   — 25 cycles de :
      — 95 °C pendant 30 secondes
      — 62 °C pendant 30 secondes
      — 72 °C pendant 60 secondes
   — 72 °C pendant 5 minutes
   — Maintenez à 10 °C

POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ
Si vous ne procédez pas immédiatement au nettoyage PCR, la plaque **AMP** peut rester sur le thermocycleur durant la nuit ou peut être stockée entre 2 et 8 °C jusqu'à 48 heures.

Nettoyage PCR

Préparation

1 Ramenez les billes de nettoyage PCR à la température ambiante.
2 Préparez une nouvelle solution d'éthanol à 80 % à partir de l'éthanol absolu.

Procédure

1 Centrifugez la plaque AMP à 1 000 × g à 20 °C pendant 1 minute.
2 Mettez en route une nouvelle plaque MIDI (ci-après désigné comme la plaque **CLP**).
3 Renversez les billes de nettoyage PCR 10 fois. Mélangez vigoureusement à l'aide d'un agitateur vortex, puis renversez 10 fois de plus. Inspectez visuellement la solution pour vous assurer que les billes sont resuspendues.
4 Ajoutez 45 µl de des billes de nettoyage PCR dans chaque puits de la plaque **CLP**.
5 Transférez la totalité du produit PCR de la plaque AMP à la plaque **CLP**.
6 Scellez la plaque **CLP** et secouez-la dans un agitateur pour microplaques à 1 800 tr/min pendant 2 minutes.
7 Incubez à température ambiante sans secouer pendant 10 minutes.

8 Placez la plaque sur un support magnétique pendant au moins 2 minutes ou jusqu'à ce que le surnageant soit évacué.
9 Avec la plaque **CLP** sur le support magnétique, retirez soigneusement et jetez le surnageant.
10 Avec la plaque **CLP** sur le support magnétique, lavez les billes comme suit :
   a Ajoutez 200 µl d'éthanol à 80 % fraîchement préparé dans chaque puits d'échantillon.
   b Placez la plaque sur le support magnétique pendant 30 secondes ou jusqu'à ce que le surnageant soit éliminé.
   c Retirez le surnageant et mettez-le au rebut.
11 Répétez le lavage comme décrit à l'étape précédente.
12 Utilisez une pipette multi-canal P20 réglée sur 20 µl pour retirer l'excès d'éthanol.
13 Retirez la plaque **CLP** du support magnétique et séchez à l'air libre pendant 10 minutes.
14 Ajoutez 30 µl de tampon d'élution à chaque échantillon, puis mélangez brièvement.
15 Scellez la plaque **CLP** et secouez-la dans un agitateur pour microplaques à 1 800 tr/min pendant 2 minutes. Après l'avoir secouée, vérifiez si des échantillons ont été resuspendus. Si non, répétez cette étape.
16 Incubez à température ambiante pendant 2 minutes.
17 Placez la plaque **CLP** sur un support magnétique pendant au moins 2 minutes ou jusqu'à ce que le surnageant soit évacué.
18 Mettez en route une nouvelle plaque MIDI (ci-après désigné comme la plaque **LNP**).
19 Transférez 20 µl de surnageant de la plaque **CLP** à la plaque **LNP**.
20 [En option] Transférez le 10 µl restant du surnageant de la plaque **CLP** à la nouvelle plaque et étiquetez la plaque avec un nom d'analyse et une date d'analyse. Conservez cette plaque entre -15 °C et -25 °C jusqu'à la fin de l'analyse de séquençage et de l'analyse de données. Les produits PCR nettoyés peuvent être utilisés pour des efforts de dépannage en cas de pannes d'échantillon.

POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ
Si vous arrêtez à ce point, scellez la plaque **LNP** et centrifugez à 1 000 × g à 20 °C pendant 1 minute. La plaque est stable pendant une durée maximale de 3 heures entre 2 °C et 8 °C.

Normalisation de la librairie

Préparation

1 Préparez une nouvelle solution 0,1N NaOH
2 Ramenez le diluant de normalisation de librairie, les billes de librairie et le lavage de normalisation de librairie à la température ambiante.
3 Mélangez le diluant de normalisation de librairie vigoureusement et assurez-vous que tous les précipités ont complètement dissous.
4 Mélangez les billes de librairie vigoureusement pendant une minute avec inversion intermittente jusqu'à ce que les billes soient remises en suspension et qu'aucun culot ne se trouve au fond du tube lorsque celui-ci est inversé.

Procédure

1 Mélangez le diluant de normalisation de librairie et les billes de librairie dans un tube conique de 15 ml tout juste rempli comme suit :

REMARQUE
En cas de traitement < 24 échantillons, utilisez un tube de 1,5 ml tout juste rempli.

   a Pour 96 échantillons, ajoutez 4,4 ml de diluant de normalisation de librairie.
   b Pipettez les billes de librairie de haut en bas 10 fois et remettez en suspension.

REMARQUE
Il est extrêmement important de remettre en suspension complètement le culot de billes de la librairie

au fond du tube. L'utilisation d'un P1000 permet de s'assurer que les billes sont remises en suspension de manière homogène et qu'il n'y a aucune masse de billes au fond du tube. C'est essentiel pour atteindre la densité régulière des amplifiats sur le Flow Cell.

   c Pour 96 échantillons, pipettez 800 µl de billes de librairie dans le tube contenant le diluant de normalisation de librairie.
   d Mélangez en retournant le tube 15 à 20 fois.
2 Ajoutez 45 µl de la solution de travail diluant de normalisation de librairie / billes de librairie combinée à chaque puits de la plaque **LNP** contenant des librairies.
3 Scellez la plaque **LNP** et secouez sur un agitateur pour microplaques à 1 800 tr/min pendant 30 minutes.
4 Placez la plaque sur un support magnétique pendant au moins 2 minutes ou jusqu'à ce que le surnageant soit évacué.
5 La plaque **LNP** sur un support magnétique, retirez avec précaution le surnageant et mettez-le au rebut.
6 Déposez la plaque **LNP** du support magnétique et lavez les billes avec le lavage de normalisation de librairie comme suit :
   a Ajoutez 45 µl de lavage de normalisation de librairie à chaque puits d'échantillon.
   b Scellez la plaque **LNP** et secouez sur un agitateur pour microplaques à 1 800 tr/min pendant 5 minutes.
   c Placez la plaque sur un support magnétique pendant au moins 2 minutes ou jusqu'à ce que le surnageant soit évacué.
   d Retirez le surnageant et mettez-le au rebut.
7 Répétez la procédure de lavage de normalisation de librairie comme décrit à l'étape précédente.
8 Utilisez une pipette multicanaux P20 réglée à 20 µl pour retirer tout excès de lavage de normalisation de librairie.
9 Déposer la plaque **LNP** du support magnétique et ajoutez 30 µl de la solution 0,1 N NaOH à chaque puits.
10 Scellez la plaque **LNP** et secouez sur un agitateur pour microplaques à 1 800 tr/min pendant 5 minutes.
11 Pendant l'élution de 5 minutes, prévoyez une nouvelle plaque PCR à 96 puits (ci-après dénommée la plaque **SGP**).
12 Ajoutez 30 µl de tampon de stockage de librairie à chaque puits à utiliser dans la plaque **SGP**.
13 Après l'élution de 5 minutes, assurez-vous que tous les échantillons dans la plaque **LNP** sont complètement remis en suspension. Si les échantillons ne sont pas complètement remis en suspension, pipettez doucement ces échantillons de haut en bas ou tapotez doucement la plaque sur le banc pour remettre en suspension les billes, puis secouez pendant encore 5 minutes.
14 Placez la plaque **LNP** sur le support magnétique pendant au moins 2 minutes.
15 Transférez le surnageant de la plaque **LNP** à la plaque **SGP**. Pipettez de haut en bas 5 fois pour mélanger.
16 Scellez la plaque **SGP** et centrifugez à 1 000 × g à 20 °C pendant 1 minute.

POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ

Si vous ne procédez pas immédiatement au groupement des librairies et au séquençage ultérieur sur le MiSeqDx, stockez la plaque **SGP** à une température comprise entre -15 et -25 °C pendant 3 jours au maximum.

Groupement des librairies

Préparer le groupage de librairies

1 Réglez un bloc chauffant convenable aux tubes à centrifuger de 1,5 ml sur 96 °C.
2 Dans un seau à glace, préparez un bain d'eau glacée. Faites refroidir le tampon de dilution de librairie dans le bain d'eau glacée.
3 Commencez par décongeler la cartouche de réactifs de MiSeqDx.

Préparer une nouvelle dilution de NaOH

ATTENTION

L'utilisation de NaOH nouvellement dilué est essentielle pour dénaturer complètement les échantillons pour la génération d'amplifiats sur le MiSeqDx.

1 Combinez les volumes suivants dans un tube de microcentrifugeuse :
   — Eau de laboratoire (900 µl)
   — Stock de 1,0 N NaOH (100 µl)
2 Retournez le tube plusieurs fois pour mélanger.

Dénaturer et diluer Contrôle interne PhiX

1 Combinez les volumes suivants pour diluer la librairie de contrôle interne PhiX de 2 nM :
   — Librairie de contrôle interne PhiX de 10 nM (2 µl)
   — tampon 1X TE (8 µl)
2 Combinez les volumes suivants pour obtenir une librairie de contrôle interne PhiX de 1 nM :
   — Librairie de contrôle interne PhiX de 2 nM (10 µl)
   — 0,1 N NaOH (10 µl)
3 Agitez brièvement la solution de la librairie de contrôle interne PhiX de 1 nM.
4 Centrifugez la solution du modèle à 280 × g à 20 °C pendant 1 minute.
5 Incubez à température ambiante durant 4,5 minutes pour dénaturer la librairie de contrôle interne PhiX en brins uniques.
6 Ajoutez le volume suivant de tampon de dilution de librairie réfrigéré au préalable au tube contenant la librairie contrôle interne PhiX dénaturé pour obtenir une librairie de contrôle interne PhiX de 20 pM.
   — Librairie de contrôle interne PhiX dénaturée (20 µl)
   — Tampon de dilution de librairie préalablement réfrigéré (980 µl)

Préparation de la cartouche de réactifs

1 Décongelez le test à 139 variants de la cartouche de réactifs et fibrose kystique MiSeqDx dans un bain d'eau contenant assez d'eau déionisée à température ambiante pour submerger la base de la cartouche de réactifs jusqu'à la ligne de délimitation de l'eau imprimée sur la cartouche de réactifs. Ne pas permettre à l'eau de dépasser la ligne de délimitation de l'eau maximale.
2 Laissez la cartouche de réactifs décongeler dans le bain d'eau à température ambiante pendant environ une heure ou jusqu'à décongélation complète.
3 Retirez la cartouche du bain d'eau et tapotez-la doucement contre la paillasse pour retirer l'eau de la base de la cartouche. Séchez la base de la cartouche. Assurez-vous que l'eau n'a pas éclaboussé la partie supérieure de la cartouche de réactifs.

Inspection de la cartouche de réactifs

1 Retournez la cartouche de réactifs 10 fois pour mélanger les réactifs décongelés, puis vérifiez visuellement que toutes les positions sont décongelées.

REMARQUE
Il est essentiel que les réactifs dans la cartouche soient complètement décongelés et mélangés pour assurer un séquençage correct.

2 Inspectez visuellement le réactif de l'emplacement 1 pour vérifier qu'il est complètement mélangé et qu'il ne contient pas de précipités.
3 Tapotez doucement la cartouche sur la paillasse pour réduire les bulles d'air dans les réactifs.

REMARQUE
Les tubes des dispositifs d'aspiration MiSeqDx descendant au fond de chaque réservoir pour aspirer les réactifs, il est important qu'aucune bulle d'air ne reste dans les réservoirs.

4 Placez la cartouche de réactifs sur la glace ou réservez-la à une température comprise entre 2 °C et 8 °C (jusqu'à 6 heures) jusqu'à ce que vous soyez prêt à configurer l'analyse. Pour obtenir de meilleurs résultats, chargez directement l'échantillon et configurez l'analyse.

Préparer les échantillons pour le séquençage

1 Ramenez le tampon de dilution de librairie à température ambiante. Mélangez le tampon de dilution de librairie et assurez-vous que tous les précipités sont complètement dissous.
2 Si la plaque **SGP** a été conservée congelée, décongelez la plaque **SGP** à température ambiante.
3 Centrifugez la plaque **SGP** à 1 000 × g à 20 °C pendant une minute.
4 Mettez en route un tube Eppendorf frais (ci-après désigné comme le tube **PAL**).
5 Déterminez les échantillons à regrouper pour le séquençage. Un maximum de 48 échantillons peut être regroupé pour le séquençage.
6 Si la plaque **SGP** a été conservée congelée, mélangez chaque librairie à séquencer en pipettant de haut en bas 3 à 5 fois.
7 Transférez 5 µl de chaque librairie à séquencer de la plaque **SGP** , colonne par colonne, à une barrette de tubes PCR. Scellez la **SGP** avec un timbre adhésif pour plaque et réservez.

REMARQUE
Après utilisation, conservez la plaque **SGP** scellée à une température de -15 °C à -25 °C. La plaque **SGP** scellée est stable pendant un maximum de trois jours.

8 Combinez et transférez les contenus de la barrette de huit tubes PCR dans le tube **PAL**. Mélangez le tube **PAL** complètement.
9 Mettez en route un tube Eppendorf frais (ci-après désigné comme le tube **DAL**).
10 Ajoutez 585 µl de tampon de dilution de librairie au tube **DAL**.
11 Ajoutez 6 µl de Contrôle interne PhiX de 20 pM au tube **DAL**. Pipettez de haut en bas 3 à 5 fois pour rincer la pointe et assurer un transfert total.
12 Transférez 9 µl du **PAL** dans le tube **DAL** contenant le tampon de dilution de librairie. Pipettez de haut en bas 3 à 5 fois pour rincer la pointe et assurer un transfert total.
13 Mélangez le tube **DAL** sous agitateur vortex à une vitesse maximale.
14 Centrifugez le tube **DAL** à 1 000 × g à 20 °C pendant une minute.
15 Incubez le tube **DAL** sur un bloc chauffant à 96 °C pendant 2 minutes.
16 Après l'incubation, inversez le tube **DAL** 1 à 2 fois pour mélanger, puis placez immédiatement dans un bain d'eau glacée.
17 Gardez le tube **DAL** dans un bain d'eau glacée pendant 5 minutes.

Charger les librairies d'échantillons sur la cartouche

1 Utilisez une pointe de pipette séparée, propre et vide de 1 ml pour percer l'opercule scellant le réservoir sur la cartouche de réactifs étiquetée **Load Samples** (Charger les échantillons).
2 Transférez à l'aide de la pipette 600 µl des librairies d'échantillons dans le réservoir **Load Samples** (Charger les échantillons). Prenez soin d'éviter de toucher l'opercule lors de la distribution de l'échantillon.
Vérifiez qu'il n'y ait pas de bulles d'air dans le réservoir après le chargement de l'échantillon. S'il y a des bulles d'air, tapotez doucement la cartouche sur le banc pour évacuer les bulles.
3 Passez directement à la configuration de l'analyse depuis l'interface du logiciel d'exploitation MiSeq (MOS).

Interprétation de résultats

1 Le test à 139 variants de fibrose kystique MiSeqDx Illumina est conçu pour détecter les 139 variants du CFTR, y compris ceux recommandés par l'ACMG (Tableau 2).
2 Le rapport des tests répertorie les noms d'échantillons et le génotype pour chaque variant détecté pour un échantillon.
— Tous les échantillons sont interrogés pour les 134 variants provoquant la fibrose kystique et le variant R117H recommandé par l'ACMG; seuls les allèles ayant subi une mutation sont répertoriés dans le rapport des tests.

- Le variant PolyTG/PolyT est rapporté uniquement si la variation R117H est identifiée pour un échantillon. Pour les patients présentant un variant R117H, des tests supplémentaires doivent être effectués pour déterminer si un variant PolyTG/PolyT, qui peut affecter le phénotype clinique [p. ex., 12-13 (TG) ou 5T], présente une orientation cis/trans sur le variant R117H.

  REMARQUE
  Le génotype PolyTG/PolyT est déterminé par le test à 139 variants de fibrose kystique MiSeqDx Illumina en se basant sur le nombre de lectures des génotypes les plus courants. En raison de la nature numérique du séquençage de dernière génération, le test permet d'atteindre un niveau élevé de précision à partir de plusieurs observations par rapport à d'autres technologies basées sur le séquençage qui utilisent seulement quelques observations.

- Lorsqu'un échantillon présente un génotype F508del ou I507del homozygote, si un ou plusieurs des trois polymorphismes bénins I506V, I507V et F508C sont détectés, cela est rapporté pour l'échantillon. Si les trois polymorphismes bénins sont tous de type sauvage, le rapport indique que les variants I506V, I507V et F508C ne sont pas présents pour l'échantillon.

  REMARQUE
  Étant donné qu'il s'agit d'un test basé sur le séquençage, il n'existe aucune interférence avec la signalisation de la mutation F508del ou I507del en raison des trois polymorphismes bénins. Par conséquent, aucune correction n'est apportée au résultat détecté.

- Le résultat du génotype est rapporté comme HET lorsqu'un échantillon est identifié comme hétérozygote et les allèles de type sauvage et mutant sont détectés pour l'échantillon.
- Le résultat du génotype est rapporté comme HOM lorsqu'un échantillon est identifié comme homozygote et seul l'allèle mutant est détecté pour l'échantillon.
- Si aucun variant n'est identifié pour un échantillon, le rapport indique « No panel variants are detected » (Aucun variant de panel n'a été détecté).

3 Le rapport des tests fournit des renseignements relatifs au taux de définition d'échantillon pour chaque échantillon. Le taux d'appel est calculé comme suit : nombre de positions/régions de variants qui correspondent à un seuil de valeur de confiance prédéfinie divisé par nombre total de positions/régions interrogées.
   - Pour des échantillons nécessitant des signalements conditionnels, les variants supplémentaires interrogés sont également pris en compte dans le calcul du taux d'appel.
   - Tout variant présentant une valeur de confiance prédéfinie inférieure au seuil est rapporté comme un « Aucun-appel ». Il est recommandé de répéter l'échantillon.

4 Un résultat d'échantillon est considéré comme étant valide uniquement si le taux d'appel est ≥ 99 %. Si le taux d'appel est inférieur à 99 %, la performance est rapportée comme « Fail » (Échec), et l'échantillon doit être répété.
   REMARQUE : Si le taux d'appel d'échantillon est < 50 %, la performance est rapportée comme « Fail » (Échec) et la mention « Sample Failed » (Échec de l'échantillon) est indiquée sur le rapport. Aucun renseignement relatif aux variants ne sera affiché. Cet échantillon doit être répété.

5 Il est recommandé de soumettre les variants validés à l'aide d'échantillons synthétiques (voir le tableau de précision) à une vérification par l'utilisateur au moyen d'une méthode de référence avant de rapporter les premiers résultats de patient avec ces variants.

6 Si deux variants ou plus sont identifiés pour un échantillon, il est recommandé que l'utilisateur vérifie le résultat en répétant l'échantillon à l'aide du test à 139 variants de fibrose kystique MiSeqDx Illumina avec un nouvel extrait d'ADNg pour écarter une contamination croisée de l'échantillon.
   REMARQUE : Une mise en phase de l'haplotype doit être envisagée lorsque deux variants ou plus sont détectés.

7 Toutes les interprétations des variants doivent être effectuées par un généticien moléculaire clinique diplômé ou équivalent, conformément aux directives et procédures locales[15]. Les références d'interprétation possibles

incluent, mais sans s'y limiter : la base de données CFTR2[11], l'article de Sosnay[13], les directives de l'ACMG en 2004[1] et l'avis du comité ACOG en 2011[2].

Pour plus de renseignements sur la méthode de calcul et de présentation des résultats, ou pour obtenir une description du contenu du rapport de fichier texte, consultez le *Guide de l'utilisateur de MiSeq Reporter (nº 15038356_ FRA)*.

Procédures de contrôle qualité

Les bonnes pratiques de laboratoire exigent que le matériel de contrôle soit évalué, pour détecter d'éventuelles différences dans le traitement du sang et les procédures techniques dans le laboratoire de l'utilisateur qui pourraient entraîner une variabilité significative dans les résultats.

1. **Contrôles positifs** : un échantillon de contrôle positif d'ADN est requis pour chaque analyse. L'échantillon de contrôle positif d'ADN doit être un échantillon correctement caractérisé par au moins un variant CFTR connu.[16] Illumina recommande d'alterner les contrôles positifs conformes aux normes techniques et directives 2008 de l'ACMG (American College of Medical Genetics) pour les tests de mutation de la FK[17] et aux normes de laboratoire clinique 2013 de l'ACMG pour le séquençage de nouvelle génération.[18] L'échantillon de contrôle positif doit générer le génotype attendu. Si le contrôle positif génère un génotype différent de celui attendu, alors il y a peut-être eu une erreur dans le suivi de l'échantillon ou un enregistrement incorrect des primers d'indexage. Le test entier doit être refait, commençant par la préparation de librairie.
2. **Contrôle négatif (sans modèle ni ADN)** : l'utilisation d'un contrôle négatif (sans modèle ni ADN) est requise pour chaque analyse, de façon à détecter les cas possibles de contamination. Le débit d'appel pour le contrôle négatif doit être inférieur à 10 %. Si un contrôle négatif génère un débit d'appel > 10 %, cela signifie qu'une contamination a peut-être eu lieu durant le traitement du test. Le test est considéré un échec et le test entier doit être refait, commençant par la préparation de librairie.
3. **Contrôle de type sauvage** : l'échantillon de contrôle d'ADN de type sauvage est recommandé à chaque analyse. L'échantillon de contrôle de type sauvage doit être un échantillon correctement caractérisé ne contenant pas de variants CFTR. L'échantillon de contrôle de type sauvage doit générer le génotype attendu. Si le contrôle de type sauvage génère un génotype différent de celui attendu, alors il y a peut-être eu une erreur dans le suivi de l'échantillon ou un enregistrement incorrect des primers d'indexage. Le test entier doit être refait, en commençant par la préparation de la librairie.
4. Avant la première utilisation de ce produit dans le laboratoire de l'utilisateur, les performances du test doivent être vérifiées en testant un nombre d'échantillons positifs et négatifs ayant des caractéristiques de performance connues.
5. Toutes les exigences de contrôle de la qualité doivent être effectuées conformément aux réglementations locales, régionales et/ou fédérales ou aux exigences d'accréditation.

Caractéristiques de performance

Précision

La précision du test à 139 variants de fibrose kystique MiSeqDx Illumina a été évaluée en évaluant 500 échantillons représentant un large éventail de variants CFTR provenant de quatre sources distinctes. La source principale de données de précision était une étude de précision clinique menée en utilisant un panel de 366 échantillons. La majorité (n = 355) des échantillons comprenaient des spécimens d'ADN cliniques archivés et anonymisés isolés à partir de sang humain, les 11 échantillons restants ont été obtenus à partir de specimens de lignée cellulaire disponible sur le marché.

Les données provenant de cette étude ont été complétées par les données de précision de 68 échantillons de lignée cellulaire dans l'étude de reproductibilité, 14 échantillons cliniques de l'étude analytique d'évaluation de la méthode d'extraction et 52 échantillons de plasmide synthétique. Les plasmides synthétiques ont été conçus pour inclure le contexte génomique des variants rares, et contenaient partout entre un à neuf variants dans la même structure. Ils ont été linéarisés, dilués en des nombres de copies équivalents d'ADN génomique, puis mélangés avec des échantillons d'ADN génomique humain présentant un génotype de type sauvage avec des nombres de copies équivalents pour imiter un échantillon hétérozygote.

Les résultats de génotypage pour les 137 petits sites InDel/SNV, comprenant la région PolyTG/PolyT ont été comparés à une analyse de séquence bidirectionnelle Sanger. Deux tests validés basés sur la PCR ont été utilisés comme méthode de référence pour les deux grandes délétions du panel. Chaque test duplex PCR a utilisé deux ensembles de primer pour faire la distinction entre les génotypes de type sauvage, hétérozygote et homozygote. L'un des ensembles de primer a été conçu pour border les points de rupture de délétion, tandis que l'autre a amplifié une région interne de la délétion. Les deux produits ont été détectés par une séparation de taille sur un gel d'agarose.

Les tests PCR ont été validés en utilisant un panel de 28 échantillons au total (22 échantillons pour chaque délétion) composé d'échantillons d'ADN génomique dérivés de sang et de lignée cellulaire et de plasmides synthétiques, qui englobait les génotypes TS, HET et HOM pour chaque grande délétion. Les tests PCR ont été confirmés avec une spécificité et une reproductibilité à 100 % pour tous les échantillons testés, par le biais d'une évaluation de produits PCR sur un gel d'agarose. La précision des tests PCR a été confirmée au moyen d'un séquençage Sanger et avec une valeur de 100 % pour tous les échantillons.

La précision a été déterminée pour chaque génotype à l'aide de trois mesures statistiques. Une concordance positive a été calculée pour chaque génotype de variant en divisant le nombre d'échantillons ayant des appels de variant concordants par le nombre total d'échantillons ayant ce variant tel qu'indiqué par les méthodes de référence. Une concordance négative a été calculée à travers toutes les positions de type sauvage (TS) en divisant le nombre de positions de TS concordantes par le nombre total de positions TS tel qu'indiqué par les méthodes de référence. La concordance globale (CG) a été calculée à travers toutes les positions signalées en divisant le nombre de TS concordants et des positions de variantes par le nombre total de positions signalées tel que déterminé par les méthodes de référence.

Le test à 139 variants de fibrose kystique MiSeqDx Illumina présentait une CP au niveau du génotype de 100 %. La CN pour toutes les positions TS était > 99,99 %, et la CG pour toutes les positions rapportées était > 99,99 %. Tous les résultats des tests sont basés sur des tests initiaux.

Tableau 15 Précision globale du test à 139 variants de fibrose kystique MiSeqDx Illumina

Variant (nom courant)	Type de variant	Nom d'ADNc	Nombre total d'appels par variant	Appels positifs (variants)			Appels négatifs (type sauvage)	Nº de ratés de typage	Nº d'aucun-appels	Concor-dance positive (%)	Concor-dance négative (%)	Concor-dance globale (%)
				Échan-tillons cliniques	Échan-tillons de lignée cellulaire	Échan-tillons synthé-tiques						
CFTR dele2, 3	DEL	c.54-5940_273+10250 del21kb	500	4	1	0	495	0	0	100	100	100
E60X	SNV	c.178G>T	500	6	1	0	493	0	0	100	100	100
P67L	SNV	c.200C>T	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
R75X	SNV	c.223C>T	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
G85E	SNV	c.254G>A	500	6	2	0	492	0	0	100	100	100
394delTT	DIV	c.262_263 delTT	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
406-1G>A	SNV	c.274-1G>A	500	4	0	0	496	0	0	100	100	100
E92X	SNV	c.274G>A	500	0	1	1	498	0	0	100	100	100
D110H	SNV	c.328G>C	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
R117C	SNV	c.349C>T	500	4	0	0	496	0	0	100	100	100
R117H	SNV	c.350G>A	500	17	2	0	481	0	0	100	100	100
Y122X	SNV	c.366T>A	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
621+1G>T	SNV	c.489+1G>T	500	7	5	0	488	0	0	100	100	100
663delT	DIV	c.531delT	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100

Variant (nom courant)	Type de variant	Nom d'ADNc	Nombre total d'appels par variant	Appels positifs (variants)			Appels négatifs (type sauvage)	Nº de ratés de typage	Nº d'aucun-appels	Concor-dance positive (%)	Concor-dance négative (%)	Concor-dance globale (%)
				Échan-tillons cliniques	Échan-tillons de lignée cellulaire	Échan-tillons synthé-tiques						
G178R	SNV	c.532G>A	500	1	1	0	498	0	0	100	100	100
711+1G>T	SNV	c.579+1G>T	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
P205S*	SNV	c.613C>T	500	1	0	1	498	0	0	100*	100	100
L206W	SNV	c.617T>G	500	8	1	0	491	0	0	100	100	100
1078delT	DIV	c.948delT	500	1	1	0	498	0	0	100	100	100
G330X	SNV	c.988G>T	500	1	1	0	498	0	0	100	100	100
R334W	SNV	c.1000C>T	500	6	1	0	493	0	0	100	100	100
I336K	SNV	c.1007T>A	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
1154insTC	DIV	c.1022_1023 insTC	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
R347H	SNV	c.1040G>A	500	6	1	1	492	0	0	100	100	100
R347P	SNV	c.1040G>C	500	3	2	0	495	0	0	100	100	100
R352Q	SNV	c.1055G>A	500	5	0	0	495	0	0	100	100	100
A455E	SNV	c.1364C>A	500	4	2	0	494	0	0	100	100	100
S466X (C>G)	SNV	c.1397C>G	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
1548delG	DIV	c.1418delG	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100

Variant (nom courant)	Type de variant	Nom d'ADNc	Nombre total d'appels par variant	Appels positifs (variants)			Appels négatifs (type sauvage)	Nº de ratés de typage	Nº d'aucun-appels	Concor-dance positive (%)	Concor-dance négative (%)	Concor-dance globale (%)
				Échan-tillons cliniques	Échan-tillons de lignée cellulaire	Échan-tillons synthé-tiques						
Q493X	SNV	c.1477C>T	500	4	2	0	494	0	0	100	100	100
I507del	DIV	c.1519_1521 delATC	500	4	2	0	494	0	0	100	100	100
F508del	DIV	c.1521_1523 delCTT	500	84	29	0	387	0	0	100	100	100
1677delTA	DIV	c.1545_1546 delTA	500	1	0	0	499	0	0	100	100	100
V520F	SNV	c.1558G>T	500	2	0	0	498	0	0	100	100	100
1717-1G>A	SNV	c.1585-1G>A	500	4	1	0	495	0	0	100	100	100
G542X	SNV	c.1624G>T	500	12	3	0	485	0	0	100	100	100
S549N	SNV	c.1646G>A	500	2	2	1	495	0	0	100	100	100
S549R (c.1647T>G)	SNV	c.1647T>G	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
G551D	SNV	c.1652G>A	500	8	3	0	489	0	0	100	100	100
R553X	SNV	c.1657C>T	500	8	2	0	490	0	0	100	100	100
A559T	SNV	c.1675G>A	500	4	0	1	495	0	0	100	100	100
R560T	SNV	c.1679G>C	500	6	1	0	493	0	0	100	100	100

Variant (nom courant)	Type de variant	Nom d'ADNc	Nombre total d'appels par variant	Appels positifs (variants)			Appels négatifs (type sauvage)	Nº de ratés de typage	Nº d'aucun-appels	Concor-dance positive (%)	Concor-dance négative (%)	Concor-dance globale (%)
				Échan-tillons cliniques	Échan-tillons de lignée cellulaire	Échan-tillons synthé-tiques						
1812-1 G>A	SNV	c.1680-1G>A	500	0	2	0	498	0	0	100	100	100
1898+1G>A	SNV	c.1766+1G>A	500	2	1	0	497	0	0	100	100	100
2143delT	DIV	c.2012delT	500	2	1	0	497	0	0	100	100	100
2183AA>G	DIV	c.2051_2052delAAinsG	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
2184insA	DIV	c.2052_2053insA	500	3	0	1	496	0	0	100	100	100
2184delA	DIV	c.2052delA	500	1	1	0	498	0	0	100	100	100
R709X	SNV	c.2125C>T	500	1	0	2	497	0	0	100	100	100
K710X	SNV	c.2128A>T	500	3	0	0	497	0	0	100	100	100
2307insA	DIV	c.2175_2176insA	500	3	0	2	495	0	0	100	100	100
R764X	SNV	c.2290C>T	500	1	0	2	497	0	0	100	100	100
W846X	SNV	c.2537G>A	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
2789+5G>A	SNV	c.2657+5G>A	500	9	1	0	490	0	0	100	100	100
Q890X	SNV	c.2668C>T	500	1	0	0	499	0	0	100	100	100
3120G>A	SNV	c.2988G>A	500	1	0	0	499	0	0	100	100	100

Variant (nom courant)	Type de variant	Nom d'ADNc	Nombre total d'appels par variant	Appels positifs (variants)			Appels négatifs (type sauvage)	Nº de ratés de typage	Nº d'aucun-appels	Concor-dance positive (%)	Concor-dance négative (%)	Concor-dance globale (%)
				Échan-tillons cliniques	Échan-tillons de lignée cellulaire	Échan-tillons synthé-tiques						
3120+1G>A	SNV	c.2988+1G>A	500	7	1	0	492	0	0	100	100	100
3272-26A>G	SNV	c.3140-26A>G	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
R1066C	SNV	c.3196C>T	500	6	0	0	494	0	0	100	100	100
R1066H	SNV	c.3197G>A	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
W1089X	SNV	c.3266G>A	500	4	0	0	496	0	0	100	100	100
Y1092X (C>A)	SNV	c.3276C>A	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
M1101K	SNV	c.3302T>A	500	2	2	0	496	0	0	100	100	100
R1158X	SNV	c.3472C>T	500	7	1	0	492	0	0	100	100	100
R1162X	SNV	c.3484C>T	500	5	1	0	494	0	0	100	100	100
3659delC	DIV	c.3528delC	500	4	1	0	495	0	0	100	100	100
S1196X	SNV	c.3587C>G	500	1	0	0	499	0	0	100	100	100
3791delC	DIV	c.3659delC	500	2	0	0	498	0	0	100	100	100
3849+10kbC>T	SNV	c.3717+12191C>T	500	11	2	0	487	0	0	100	100	100
3876delA	DIV	c.3744delA	500	6	1	0	493	0	0	100	100	100
S1251N	SNV	c.3752G>A	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100

Variant (nom courant)	Type de variant	Nom d'ADNc	Nombre total d'appels par variant	Appels positifs (variants)			Appels négatifs (type sauvage)	Nº de ratés de typage	Nº d'aucun-appels	Concor-dance positive (%)	Concor-dance négative (%)	Concor-dance globale (%)
				Échan-tillons cliniques	Échan-tillons de lignée cellulaire	Échan-tillons synthé-tiques						
3905insT	DIV	c.3773_3774insT	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
W1282X	SNV	c.3846G>A	500	9	1	0	490	0	0	100	100	100
N1303K	SNV	c.3909C>G	500	9	1	0	490	0	0	100	100	100
CFTR dele22,23§	DEL	c.3964-78_4242+577del	500	1	0	1	498	1§	0	100	99,80	99,80
M1V	SNV	c.1A>G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q39X	SNV	c.115C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
405+1 G>A	SNV	c.273+1G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
E92K	SNV	c.274G>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q98X	SNV	c.292C>T	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
457TAT>G	DIV	c.325_327delTATinsG	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
574delA	DIV	c.442delA	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
711+3A>G	SNV	c.579+3A>G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
711+5 G>A	SNV	c.579+5G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
712-1 G>T	SNV	c.580-1G>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100

Variant (nom courant)	Type de variant	Nom d'ADNc	Nombre total d'appels par variant	Appels positifs (variants)			Appels négatifs (type sauvage)	Nº de ratés de typage	Nº d'aucun-appels	Concor-dance positive (%)	Concor-dance négative (%)	Concor-dance globale (%)
				Échan-tillons cliniques	Échan-tillons de lignée cellulaire	Échan-tillons synthé-tiques						
H199Y	SNV	c.595C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q220X	SNV	c.658C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
852del22	DIV	c.720741 delAGGG AGAAT GATGAT GAAGTAC	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
T338I	SNV	c.1013C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
S341P	SNV	c.1021T>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1213delT	DIV	c.1081delT	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1248+1G>A	SNV	c.1116+1G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1259insA	DIV	c.1127_1 128insA	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
W401X (c.1202G>A)	SNV	c.1202G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
W401X (c.1203G>A)	SNV	c.1203G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1341+1G>A	SNV	c.1209+1G>A	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100

Variant (nom courant)	Type de variant	Nom d'ADNc	Nombre total d'appels par variant	Appels positifs (variants)			Appels négatifs (type sauvage)	Nº de ratés de typage	Nº d'aucun-appels	Concor-dance positive (%)	Concor-dance négative (%)	Concor-dance globale (%)
				Échan-tillons cliniques	Échan-tillons de lignée cellulaire	Échan-tillons synthé-tiques						
1461ins4	DIV	c.1329_1330ins AGAT	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1525-1G>A	SNV	c.1393-1G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
S466X (C>A)	SNV	c.1397C>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L467P	SNV	c.1400T>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
S489X	SNV	1466C>A	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
S492F	SNV	c.1475C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q525X	SNV	c.1573C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1717-8G>A	SNV	c.1585-8G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
S549R (c.1645A>C)	SNV	c.1645A>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q552X	SNV	c.1654C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
R560K	SNV	c.1679G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1811+1.6 kb A>G	SNV	c.1679+1.6 kbA>G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
E585X	SNV	c.1753G>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100

Variant (nom courant)	Type de variant	Nom d'ADNc	Nombre total d'appels par variant	Appels positifs (variants)			Appels négatifs (type sauvage)	Nº de ratés de typage	Nº d'aucun-appels	Concor-dance positive (%)	Concor-dance négative (%)	Concor-dance globale (%)
				Échan-tillons cliniques	Échan-tillons de lignée cellulaire	Échan-tillons synthé-tiques						
1898+3A>G	SNV	c.1766+3A>G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L732X	SNV	c.2195T>G	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
2347delG	DIV	c.2215delG	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
2585delT	DIV	c.2453delT	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
E822X	SNV	c.2464G>T	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
2622+1G>A	SNV	c.2490+1G>T	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
E831X	SNV	c.2491G>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
R851X	SNV	c.2551C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
2711delT	DIV	c.2583delT	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L927P	SNV	c.2780T>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
S945L	SNV	c.2834C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
3007delG	DIV	c.2875delG	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
G970R	SNV	c.2908G>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
3121-1G>A	SNV	c.2989-1G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L1065P	SNV	c.3194T>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L1077P^	SNV	c.3230T>C	500	0	0	1	499	0^	0	100	100	100

Variant (nom courant)	Type de variant	Nom d'ADNc	Nombre total d'appels par variant	Appels positifs (variants)			Appels négatifs (type sauvage)	Nº de ratés de typage	Nº d'aucun-appels	Concor-dance positive (%)	Concor-dance négative (%)	Concor-dance globale (%)
				Échan-tillons cliniques	Échan-tillons de lignée cellulaire	Échan-tillons synthé-tiques						
Y1092X(C>G)	SNV	c.3276C>G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
E1104X	SNV	c.3310G>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
W1204X (c.3611G>A)	SNV	c.3611G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
W1204X (c.3612G>A)	SNV	c.3612G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
G1244E	SNV	c.3731G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
4005+1G>A	SNV	c.3873+1G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
4016insT	DIV	c.3884_3885insT	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q1313X	SNV	c.3937C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
4209TGTT>AA	DIV	c.4077_4080delTGTTinsAA	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
4382delA	DIV	c.4251delA	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
PolyTG/PolyT€	PolyTGPolyT	c.1210-12T[5_9]	19	17	2	0	0	0	0	100	S.O.	100
I506V¥	SNV	c.1516A>G	1	0	0	0	1	0	0	S.O.	100	100

Variant (nom courant)	Type de variant	Nom d'ADNc	Nombre total d'appels par variant	Appels positifs (variants)			Appels négatifs (type sauvage)	Nº de ratés de typage	Nº d'aucun-appels	Concor-dance positive (%)	Concor-dance négative (%)	Concor-dance globale (%)
				Échan-tillons cliniques	Échan-tillons de lignée cellulaire	Échan-tillons synthé-tiques						
I507V¥	SNV	c.1519A>G	1	0	0	0	1	0	0	S.O.	100	100
F508C¥	SNV	c.1523T>G	1	0	0	0	1	0	0	S.O.	100	100
Total			67522	557			66965	1	0	100	> 99,99	> 99,99

DIV est l'acronyme pour variant de délétion/insertion.
* Le rapport Sanger a indiqué le variant P205S comme hétérozygote pour l'échantillon clinique. Une révision des données de suivi de Sanger a cependant indiqué que le variant était en réalité homozygote et rapporté de manière incorrecte. Le système MiSeqDx a signalé le variant comme étant homozygote.
§ Un échantillon d'hétérozygote synthétique pour exon 8 a été rapporté comme hétérozygote pour le variant CFTR dele22, 23. Un examen approfondi a révélé que ce résultat provient probablement d'une faible contamination.
^ Il a été déterminé que l'échantillon hétérozygote synthétique d'origine a été préparé de manière incorrecte. Lorsqu'il a été testé ultérieurement après avoir été préparé à nouveau, en utilisant le même plasmide, il a pu être détecté.
€ Avec un résultat R117H positif, le variant PolyTG/PolyT est également rapporté.
¥ Dans le cas d'un variant F508del homozygote, trois bases de type sauvage supplémentaires (c.-à-d. variants I506V, I507V, F508C) qui n'ont pas été identifiées dans l'échantillon ont également été rapportées.

Tableau 16 Précision du test à 139 variants de la fibrose kystique MiSeqDx pour I506V, I507V et F508C.

Variant (nom courant)	Nombre total d'appels par variant	Appels positifs (variants)			Appels négatifs (type sauvage)	Nº de ratés de typage	Nº d'aucun-appels	Concordance positive (%)	Concordance négative (%)	Concordance globale (%)
		Échantillons cliniques	Échantillons de lignée cellulaire	Échantillons synthétiques						
I506V	500	7	0	0	493	0	0	100	100	100
I507V	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
F508C	500	1	1	0	498	0	0	100	100	100

Tableau 17 Précision du test à 139 variants de la fibrose kystique MiSeqDx pour les variants PolyTG/PolyT

Génotype PolyTGPolyT	Nº d'échantillons cliniques	Nº d'échantillons de lignée cellulaire	Nº d'échantillons synthétiques	Nº de ratés de typage	Nº d'aucun-appels	Précision en %
(TG)9(T)7/(TG)11(T)7	2	0	0	0	1	50
(TG)9(T)9/(TG)10(T)7	1	0	0	0	0	100
(TG)9(T)9/(TG)11(T)7	5	1	0	0	0	100
(TG)9(T)9/(TG)11(T)9	1	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	25	8	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	39	16	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)11(T)5	2	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	72	11	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)12(T)5	1	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)12(T)7	10	1	0	0	1	90.9
(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	7	6	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11(T)5	5	0	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	76	20	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11(T)9	3	0	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)12(T)5	3	2	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)12(T)7	13	0	0	0	1	92.3
(TG)11(T)5/(TG)11(T)7	6	0	0	1	0	83.3
(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	52	8	0	0	0	100
(TG)11(T)7/(TG)11(T)9^	2	1	0	3^	0	0

Génotype PolyTGPolyT	Nº d'échantillons cliniques	Nº d'échantillons de lignée cellulaire	Nº d'échantillons synthétiques	Nº de ratés de typage	Nº d'aucun-appels	Précision en %
(TG)11(T)7/(TG)12(T)5	2	0	0	0	0	100
(TG)11(T)7/(TG)12(T)7	37	3	0	0	0	100
(TG)11(T)9/(TG)12(T)7	3	0	0	0	0	100
(TG)12(T)7/(TG)12(T)7	2	2	0	0	0	100
Total**	448			4	3	98.44

* Les échantillons n'ont pas été ré-analysés.

^ L'un des résultats discordants provient de l'étude de reproductibilité. Le résultat PolyTG/PolyT pour l'échantillon est concordant sur tous les 18 réplicats, mais discordant avec le séquençage bidirectionnel Sanger.

** Le nombre total d'échantillons pour le variant PolyTG/PolyT est de 448, car tous les échantillons synthétiques (n = 52) ont été conçus en mélangeant des plasmides linéarisés avec un échantillon de lignée cellulaire sur deux, qui faisaient partie de l'étude de reproductibilité. Comme le rapport du variant PolyTG/PolyT pour ces échantillons synthétiques supplémentaires entraînerait un rapport excédentaire du variant, ces échantillons synthétiques ont été exclus de cette analyse.

Reproductibilité

La reproductibilité du système pour fibrose kystique MiSeqDx a été déterminée par une étude en insu utilisant trois sites d'essai et deux opérateurs sur chaque site. Deux panels bien caractérisés de 46 échantillons chacun ont été analysés par chacun des opérateurs sur chaque site pour un total de 810 appels par site. Ces panels contenaient un mélange d'ADN génomique issu des lignées cellulaires lymphoblastiques ayant des variants connus dans le gène *CFTR*, ainsi que du sang déleucocyté enrichi de lignées cellulaires lymphoblastiques ayant des variants connus dans le gène *CFTR*. Les échantillons de sang ont été fournis pour permettre l'incorporation des étapes d'extraction utilisées dans la préparation d'ADNg qui sert d'entrée primaire pour le flux de travail du test.

Le débit de passage des échantillons, défini comme le nombre d'échantillons passant les métriques QC lors de la première tentative, était de 99,9 %.

La concordance positive au niveau du génotype pour tous les variants était de 99,77 %. La concordance négative pour toutes les positions TS était de 99,88 % et la concordance globale pour toutes les positions rapportées était de 99,88 %. Tous les résultats des tests sont basés sur des tests initiaux. Aucun test de répétition n'a été effectué pour l'étude de reproductibilité.

Tableau 18 Reproductibilité du test à 139 variants de la fibrose kystique MiSeqDx

Panel	Nº d'échantillon	Génotype d'échantillon	Variants	Nombre total d'appels par site	Appels concordants positifs (variants)			Appels concordants négatifs (type sauvage)			Nº de ratés de typage	Nº d'aucun-appels	Concordance positive (%)	Concordance négative (%)	Concordance globale (%)
					Site 1	Site 2	Site 3	Site 1	Site 2	Site 3					
A	1	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	2	1812-1 G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	3	Q493X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	4*	F508del/2184delA (HET)		810	12	12	12	797	798	798	0	1*	100	100	100
A	5^	Y122X/R1158X (HET)		810	12	10	12	798	665	798	0	135^	94,44	94,44	94,44
A	6	F508del/2183AA>G (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	7	R75X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100

Panel	Nº d'échantillon	Génotype d'échantillon	Variants	Nombre total d'appels par site	Appels concordants positifs (variants)			Appels concordants négatifs (type sauvage)			Nº de ratés de typage	Nº d'aucun-appels	Concordance positive (%)	Concordance négative (%)	Concordance globale (%)
					Site 1	Site 2	Site 3	Site 1	Site 2	Site 3					
A	8	I507del/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	9**	F508del/W1282X (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2**	0	97,22	99,96	99,92
A	10**	F508del/3272-26A>G (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2**	0	97,22	99,96	99,92
A	11	F508del/3849+10kbC>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	12	621+1G>T/3120+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	13	E60X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	14	M1101K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	15	M1101K (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	16	F508del (CDM)	Absence de I506V, I507V et F508C	828	6	6	6	822	822	822	0	0	100	100	100
A	17	F508del/3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Panel	Nº d'échantillon	Génotype d'échantillon	Variants	Nombre total d'appels par site	Appels concordants positifs (variants)			Appels concordants négatifs (type sauvage)			Nº de ratés de typage	Nº d'aucun-appels	Concordance positive (%)	Concordance négative (%)	Concordance globale (%)
					Site 1	Site 2	Site 3	Site 1	Site 2	Site 3					
A	18	R117H/F508del (HET)	(TG)10 (T)9/ (TG)12 (T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
A	19	621+1G>T/711+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	20	G85E/621+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	21	A455E/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	22	F508del/R560T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	23	F508del/Y1092X (C>A) (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	24	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	25	G542X (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	26	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	27	G551D/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	28	3849+10kbC>T (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	29	TS		810	0	0	0	810	810	810	0	0	S.O.	100	100
A	30	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100

Panel	Nº d'échantillon	Génotype d'échantillon	Variants	Nombre total d'appels par site	Appels concordants positifs (variants)			Appels concordants négatifs (type sauvage)			Nº de ratés de typage	Nº d'aucun-appels	Concordance positive (%)	Concordance négative (%)	Concordance globale (%)
					Site 1	Site 2	Site 3	Site 1	Site 2	Site 3					
A	31	1717-1G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	32	R1162X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	33	R347P/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	34	R334W (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	35	TS		810	0	0	0	810	810	810	0	0	S.O.	100	100
A	36	G85E (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	37	I336K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	38	TS		810	0	0	0	810	810	810	0	0	S.O.	100	100
A	39	F508del/3849+10kbC>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	40	621+1G>T/3120+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	41	F508del/3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	42	R117H/F508del (HET)	(TG)10 (T)9/ (TG)12 (T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
A	43	G85E/621+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Panel	Nº d'échantillon	Génotype d'échantillon	Variants	Nombre total d'appels par site	Appels concordants positifs (variants)			Appels concordants négatifs (type sauvage)			Nº de ratés de typage	Nº d'aucun-appels	Concordance positive (%)	Concordance négative (%)	Concordance globale (%)
					Site 1	Site 2	Site 3	Site 1	Site 2	Site 3					
A	44	A455E/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	45	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	46	G551D/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	47	2789+5G>A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	48	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	49	F508del/1898+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	50	TS		810	0	0	0	810	810	810	0	0	S.O.	100	100
B	51	F508del/2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	52	3876delA (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	53	3905insT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	54	394delTT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	55	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	56	TS		810	0	0	0	810	810	810	0	0	S.O.	100	100
B	57	TS		810	0	0	0	810	810	810	0	0	S.O.	100	100

Panel	Nº d'échantillon	Génotype d'échantillon	Variants	Nombre total d'appels par site	Appels concordants positifs (variants)			Appels concordants négatifs (type sauvage)			Nº de ratés de typage	Nº d'aucun-appels	Concordance positive (%)	Concordance négative (%)	Concordance globale (%)
					Site 1	Site 2	Site 3	Site 1	Site 2	Site 3					
B	58	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	59	TS		810	0	0	0	810	810	810	0	0	S.O.	100	100
B	60	L206W (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	61	TS		810	0	0	0	810	810	810	0	0	S.O.	100	100
B	62	G330X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	63	TS		810	0	0	0	810	810	810	0	0	S.O.	100	100
B	64	R347H (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	65	1078delT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	66	G178R/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	67	S549R (c.1647T>G) (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	68	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	69	W846X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	70	TS		810	0	0	0	810	810	810	0	0	S.O.	100	100
B	71	E92X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	72§	621+1G>T/1154insTC (HET)		810	12	12	12	798	798	797	0	1§	100	99,96	99,96

Panel	Nº d'échantillon	Génotype d'échantillon	Variants	Nombre total d'appels par site	Appels concordants positifs (variants)			Appels concordants négatifs (type sauvage)			Nº de ratés de typage	Nº d'aucun-appels	Concordance positive (%)	Concordance négative (%)	Concordance globale (%)
					Site 1	Site 2	Site 3	Site 1	Site 2	Site 3					
B	73	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	74	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	75^	F508del (HET)		810	6	5	6	804	670	804	0	135^	94,44	94,44	94,44
B	76	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	77	621+1G>T/A455E (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	78	1812-1 G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	79	TS		810	0	0	0	810	810	810	0	0	S.O.	100	100
B	80	F508del/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	81	F508del/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	82	R347P/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	83	R117H/F508del (HET)	(TG)10 (T)9/ (TG)12 (T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
B	84	I507del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	85	2789+5G>A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100

Panel	Nº d'échantillon	Génotype d'échantillon	Variants	Nombre total d'appels par site	Appels concordants positifs (variants)			Appels concordants négatifs (type sauvage)			Nº de ratés de typage	Nº d'aucun-appels	Concordance positive (%)	Concordance négative (%)	Concordance globale (%)
					Site 1	Site 2	Site 3	Site 1	Site 2	Site 3					
B	86§	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	797	798	0	1§	100	99,96	99,96
B	87	F508del/1898+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	88	TS		810	0	0	0	810	810	810	0	0	S.O.	100	100
B	89	F508del/2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	90	3905insT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	91	394delTT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	92	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
Total				74556	2209			221182			4	273	99,77	99,88	99,88

* L'emplacement de type sauvage correspondant au variant N1303K pour un réplicat a abouti à un aucun-appel en raison d'une couverture insuffisante.
^ Un réplicat des échantillons 5 et 75 avait un débit d'appel de 0 %. Un examen approfondi indique que des échantillons n'ont peut-être pas été ajoutés à la plaque d'échantillons avant la préparation de la librairie, car les volumes d'échantillon restants dans les tubes ne correspondaient à aucun volume ayant été supprimé.
** Des preuves indiquent que les échantillons 9 et 10 ont été vraisemblablement échangés par l'opérateur avant la préparation de la librairie.
§ L'emplacement de type sauvage correspondant au variant M1V pour un réplicat de chacun des deux échantillons a abouti à un aucun-appel en raison d'une couverture insuffisante.

Tableau 19 Renseignements supplémentaires sur les variants de l'étude de reproductibilité

Variation (nom courant)	Type de variant	Région de gène CFTR
PolyTG/PolyT	Composé DIV*	Intron 9
2183AA>G	Composé DIV*	Exon 14
CFTR dele2, 3	DEL	Intron1-Intron3
1154insTC	DIV*	Exon 8
I507del	DIV*	Exon 11
F508del	DIV*	Exon 11
2143delT	DIV*	Exon 14
3659delC	DIV*	Exon 22
3876delA	DIV*	Exon 23
394delTT	DIV dans la région homopolymérique*	Exon 3
1078delT	DIV dans la région homopolymérique*	Exon 8
2184delA	DIV dans la région homopolymérique*	Exon 14
3905insT	DIV dans la région homopolymérique*	Exon 23
E60X	SNV	Exon 3
R75X	SNV	Exon 3
G85E	SNV	Exon 3
E92X	SNV	Exon 4
R117H	SNV	Exon 4
Y122X	SNV	Exon 4
621+1G>T	SNV	Intron 4
G178R	SNV	Exon 5
711+1G>T	SNV	Intron 5
L206W	SNV	Exon 6
G330X	SNV	Exon 8
R334W	SNV	Exon 8
I336K	SNV	Exon 8
R347P	SNV	Exon 8

Variation (nom courant)	Type de variant	Région de gène CFTR
R347H	SNV	Exon 8
A455E	SNV	Exon 10
Q493X	SNV	Exon 11
1717-1G>A	SNV	Intron 11
G542X	SNV	Exon 12
S549N	SNV	Exon 12
S549R (c.1647T>G)	SNV	Exon 12
G551D	SNV	Exon 12
R553X	SNV	Exon 12
R560T	SNV	Exon 12
1812-1 G>A	SNV	Intron 12
1898+1G>A	SNV	Intron 13
W846X	SNV	Exon 15
2789+5G>A	SNV	Intron 16
3120+1G>A	SNV	Intron 18
3272-26A>G	SNV	Intron 19
Y1092X (C>A)	SNV	Exon 20
M1101K	SNV	Exon 20
R1158X	SNV	Exon 22
R1162X	SNV	Exon 22
3849+10kbC>T	SNV	Intron 22
W1282X	SNV	Exon 23
N1303K	SNV	Exon 24

* DIV est l'acronyme pour Deletion/Insertion Variant (variant de délétion/insertion).

Extraction d'ADN

Trois méthodes d'extraction disponibles dans le commerce et couramment utilisées correspondant à l'extraction à base de billes magnétiques, la précipitation dans l'alcool et la filtration sur colonne de silice ont été évaluées à l'aide du sang total anticoagulé EDTA. Au total, 14 échantillons de sang uniques ont été utilisés dans l'étude, correspondant au génotype de type sauvage et aux trois génotypes mutants (trois échantillons avec F508del, un échantillon avec I506V et un échantillon avec D110H). Les trois méthodes d'extraction d'ADN ont été testées indépendamment par deux opérateurs différents, qui ont effectué trois analyses par méthode d'extraction. Chaque extraction a été effectuée

par chaque opérateur à des dates différentes. La concentration d'ADN et le taux A260/A280 des échantillons d'ADNg extraits ont été déterminés à l'aide de la spectrophotométrie. La taille totale des échantillons pour chaque méthode d'extraction dans cette étude était de 168 (14 échantillons x 2 opérateurs/méthode d'extraction x 3 analyses/opérateur x 2 réplicats/échantillon d'ADN génomique extrait).

Méthode d'extraction	Nombre d'échantillons testés	Débit d'appel	Précision	Débit au premier passage de l'échantillon*
Précipitation dans l'alcool	168	100 %	100 %	100 %
Filtration sur colonne de silice	168	100 %	100 %	100 %
Extraction à base de billes magnétiques	168	100 %	100 %	100 %

* Pourcentage d'échantillons présentant un taux d'appel > 99 % dans la première analyse

Entrée d'ADN

La plage d'entrées d'ADN du test à 139 variants de la fibrose kystique MiSeqDx Illumina a été évaluée en effectuant une étude de dilution en série au moyen de 14 échantillons d'ADN représentatifs contenant 16 variants de fibrose kystique uniques. Chaque échantillon a été testé en double sur 9 niveaux d'entrée d'ADN variant de 1 250 ng à 1 ng (1 250 ng, 500 ng, 250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng, 10 ng, 5 ng et 1 ng). Pour la détermination de la précision, des génotypes d'échantillon ont été comparés aux données de séquençage bidirectionnel Sanger et les délétions ont été comparées à un test PCR. Les limites supérieure et inférieure identifiées pour une entrée d'ADN sont respectivement de 1 250 ng et 25 ng, car ils présentaient un débit au premier passage ≥ 95 % sans aucun appel incorrect (précision et taux d'appel de 100 %).

Les entrées d'ADN de 1 250 ng, 250 ng et 100 ng ont été également testées avec 4 échantillons d'ADN représentatifs et au moins 20 réplicats par niveau d'entrée d'ADN pour chaque échantillon (n = 4 x 20 = 80 échantillons), tandis que la limite inférieure de 25 ng a été testée avec 14 échantillons, 20 réplicats pour chaque échantillon (n = 14 x 20 = 280 échantillons). Le débit au premier passage de la précision et de l'échantillon était de 100 % à tous les niveaux d'entrée d'ADN.

Les résultats indiquent que le test à 139 variants de la fibrose kystique MiSeqDx Illumina peut être utilisé dans la plage d'entrées d'ADN variant de 1 250 ng à 25 ng pour produire des résultats précis.

Substances interférentes

Pour évaluer l'incidence de substances interférentes sur le système pour fibrose kystique Illumina MiSeqDx, les performances du test ont été évaluées en présence et en l'absence d'éventuels éléments interférents. Huit spécimens de sang total ont été testés dans l'étude, notamment trois échantillons positifs à la fibrose kystique avec des génotypes uniques. Quatre substances interférentes endogènes (bilirubine, cholestérol, hemoglobine et triglycéride) ont été testées en les intégrant à des spécimens de sang avant l'extraction d'ADN. Les limites de concentration pour chaque substance sont indiquées dans le tableau ci-dessous. En outre, pour évaluer l'interférence résultant de la collecte de sang (petite prise), l'EDTA a été intégré aux échantillons de sang. Pour évaluer l'interférence résultant de la préparation d'échantillon, le tampon de lavage final d'une méthode de filtration sur colonne de silice a été ajouté à de l'ADN génomique purifié.

Le test à 139 variants de la fibrose kystique MiSeqDx a atteint un taux d'appel de 100 % pour tous les échantillons testés, et un taux de reproductibilité de 100 % de génotypage entre les échantillons en présence et en l'absence de substances interférentes.

Pour évaluer l'incidence d'une interférence de primer d'indexage de multiplexage, une étude de contamination croisée utilisant deux échantillons, chacun présentant des génotypes homozygotes uniques au niveau de quatre positions génomiques différentes, et deux primers d'index respectifs a été effectuée. Aucun changement

concernant l'appel de variants n'a été observé avec des niveaux de contamination < 40 %. Le génotype de l'échantillon est devenu hétérozygote avec des niveaux ≥ 40 %.

Aucune interférence n'a été observée au niveau de tous les éléments interférents endogènes ou exogènes.

Substance de test	Nombre total de réplicats	Concentration analysée dans le sang (Limite supérieure)	Concentration analysée dans le sang (Limite inférieure)	Débit d'appel
Bilirubine	16	684 µmol/l	137 µmol/l	100 %
Cholestérol	16	13 mmol/l	2,6 mmol/l	100 %
Hémoglobine	16	2 g/l	0,4 g/l	100 %
Triglycéride	16	37 mmol/l	7,4 mmol/l	100 %
EDTA	16	7 mg/ml	2,8 mg/ml	100 %

Indexage de l'échantillon

Des primers d'indexage de l'échantillon ont été utilisées pour attribuer un code-barres unique à chaque échantillon d'ADN, permettant la capacité de grouper plusieurs échantillons en une seule analyse de séquençage. Au total, 96 index d'échantillons ont été analysés à l'aide de huit échantillons d'ADN unique pour vérifier la capacité du test à faire systématiquement un génotypage pour un échantillon donné à travers des combinaisons différentes de primers d'indexage. Chaque échantillon a été analysé avec 12 combinaisons différentes de primers d'indexage. Les résultats des échantillons ont été comparés aux données de séquençage bidirectionnel Sanger pour l'ensemble des positions/variants, excepté les deux grandes délétions qui ont été confirmées à l'aide du test duplex PCR. La reproductibilité et la précision ont été 100 % pour toutes les combinaisons de primers d'échantillon/index.

Références

1 Watson MS, Cutting GR, Desnick RJ, Driscoll DA, Klinger K, et al. (2004) Cystic fibrosis population carrier screening : 2004 revision of American College of Medical Genetics mutation panel. Genetics in Medicine 6(5) : 387–391.

2 Comité sur la génétique. (April 2011) The American College of Obstetricians and Gynecologists Committee Opinion. Update on Carrier Screening for Cystic Fibrosis 486 : 1–4.

3 Bobadilla JL, Macek Jr. M, Fine JP, Farrell PM. (2002) Cystic Fibrosis: A Worldwide Analysis of CFTR Mutations—Correlation With Incidence Data and Application to Screening. Human Mutation 19:575 606.

4 Moskowitz SM, Chmiel JF, Sternan DL, Cheng E, Gibson RL, et al. (2008) Clinical practice and genetic counseling for cystic fibrosis and CFTR-related disorders. Genetics in Medicine 10(12) : 851-868.

5 Moskowitz SM, Chmiel JF, Sternen DL, Cheng E, Cutting GR. CFTR-related disorders. Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephens K, éditeurs. GeneReviews. Seattle (WA) : Université de Washington; 2008. Disponible sur www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1250. [En ligne] Mise à jour le 19 février 2008.

6 Katkin JP. (2012) Cystic fibrosis : Clinical manifestations and diagnosis. Disponible sur www.uptodate.com. [En ligne] 7 décembre 2012.

7 Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, et al. 2008 Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults : Cystic Fibrosis Foundation consensus report. J Pediatr 153(2) : S4-S14.

8 Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry: Annual Data Report 2010.

9 Cystic Fibrosis Mutation Database (CFTR1). Disponible sur www.genet.sickkids.on.ca/ app. [En ligne] Août 2013.

10 Rohlfs EM, Zhou Z, Heim R, Nagan N, Rosenblum L, et al. (2011) Cystic Fibrosis Carrier Testing in an Ethnically Diverse US Population. Clinical Chemistry; 57(6) : 841–848.
11 Clinical and Functional Translation of CFTR (CFTR2). Disponible sur www.cftr2.org. [En ligne] Août 2013.
12 The Clinical and Functional Translation of CFTR (CFTR2) Project. Disponible sur www.nacfconference.org/art/plenaryarchives/2011.Cutting.pdf. [En ligne] Présenté par Garry Cutting au nom du projet CFTR2 lors de la 25e Conférence Nord-américaine sur la fibrose kystique (NACFC) parrainée par la Fondation de la fibrose kystique. 4 novembre 2011. Anaheim, CA.
13 Sosnay PR, Siklosi KR, Van Goor F, Kaniecki K, Yu H, et al. (2013) Defining the disease liability of variants in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. Nat Genet. 25 août [Epub avant impression].
14 Grody WW, Cutting GR, Klinger KW, Richards CS, Watson MS, Desnick RJ. (March/April 2001) Laboratory standards and guidelines for population-based cystic fibrosis carrier screening. Genetics in Medicine 3(2) : 149–154.
15 Castellani C, Cuppens H, Macek H Jr, Cassiman JJ, Kerem E, et al. (2008) Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. J Cystic Fibrosis 7 :179–196.
16 Pratt VM, Caggana M, Bridges C, Buller AM, DiAntonio L, et al. (Mai 2009) Development of Genomic Reference Materials for Cystic Fibrosis Genetic Testing. Journal of Molecular Diagnostics 11(3) : 186–193.
17 Amos J, Feldman GL, Grody WW, Monaghan K, Palomaki GE, et al. (Édition 2008, révisée en mars 2011) American College of Medical Genetics Standards and Guidelines for Clinical Genetic Laboratories.
18 Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, Berg JS, Brown KK, Deignan JL, et al. (2013) ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. Genetics in Medicine. Genetics in Medicine 15(9) : 733–747.

Brevets et marques commerciales

Ce document et son contenu sont exclusifs à Illumina, Inc. et ses sociétés affiliées (« Illumina »), et sont exclusivement destinés à l'usage contractuel de son client dans le cadre de l'utilisation du ou des produits décrits dans les présentes et à aucune autre fin. Ce document et son contenu ne seront utilisés ou distribués à aucune autre fin et/ou communiqués, divulgués ou reproduits d'aucune façon sans le consentement écrit préalable d'Illumina. Illumina ne cède aucune licence en vertu de son brevet, de sa marque de commerce, de son copyright, ou de ses droits traditionnels ni des droits similaires d'un tiers quelconque par ce document.

Les instructions contenues dans ce document doivent être suivies strictement et explicitement par un personnel qualifié et adéquatement formé de façon à assurer l'utilisation correcte et sûre du ou des produits décrits dans les présentes. Le contenu intégral de ce document doit être lu et compris avant d'utiliser ces produits.

LE MANQUEMENT À LIRE COMPLÈTEMENT ET À SUIVRE EXPLICITEMENT TOUTES LES INSTRUCTIONS CONTENUES DANS LES PRÉSENTES POURRA CAUSER DES DOMMAGES AUX PRODUITS, DES BLESSURES AUX PERSONNES, UTILISATEURS OU AUTRES, ET DES DOMMAGES AUX AUTRES BIENS.

ILLUMINA REJETTE TOUTE RESPONSABILITÉ RÉSULTANT DE L'USAGE ABUSIF DU OU DES PRODUITS DÉCRITS DANS LES PRÉSENTES (Y COMPRIS LES PIÈCES DE RECHANGE DE CES PRODUITS OU LE LOGICIEL) OU DE TOUTE UTILISATION DE CE(S) PRODUITS(S) QUI SORT DU CADRE DES LICENCES OU DES PERMISSIONS ÉCRITES EXPRESSES ACCORDÉES PAR ILLUMINA EN RAPPORT À L'ACQUISITION DE CES PRODUITS PAR LE CLIENT.

DESTINÉ AU DIAGNOSTIC IN VITRO UNIQUEMENT

© 2012-2014 Illumina, Inc. Tous droits réservés.

Illumina et **MiSeqDx** sont des marques de commerce ou des marques déposées de Illumina, Inc. Les autres marques et noms contenus dans les présentes sont la propriété de leurs détenteurs respectifs.

AMPure, Beckman et Beckman Coulter sont des marques déposées ou des marques de commerce de Beckman Coulter, Inc.

Coordonnées

Illumina
San Diego, Californie 92122 États-Unis
+ (1) 800 809 ILMN (4566)
+(1) 858 202 4566 (en dehors de l'Amérique du Nord)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com

EC REP

Emergo Europe
Molenstraat 15
2513 BH La Haye
Pays-Bas

Étiquette du produit

Reportez-vous à la légende des symboles livrée avec chaque trousse pour une référence complète aux symboles qui peuvent apparaître sur l'emballage et l'étiquetage du produit.